



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 404 359 B

AK

(12) **PATENTSCHRIFT**

(21) Anmeldenummer: 769/96

(51) Int.Cl.⁶ : C12N 9/50
C07K 14/745

(22) Anmeldetag: 29. 4.1996

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 3.1998

(45) Ausgabetag: 25.11.1998

(73) Patentinhaber:

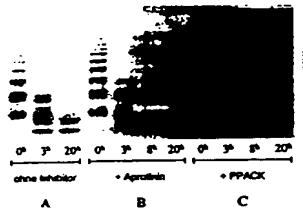
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FURLAN MIHA DR.
BERN (CH).
LÄMMLE BERNHARD
BOLLINGEN (CH).
SCHWARZ HANS PETER DR.
WIEN (AT).
TURECEK PETER DR.
KLOSTERNEUBURG WEIDLING, NIEDERÖSTERREICH (AT).
EIBL JOHANN DR.
WIEN (AT).

(54) GEREINIGTE MULTIMERASE

(57) Beschrieben wird eine gereinigte Multimerase mit einer mittelbaren bzw. unmittelbaren proteolytischen Aktivität, welche vWF mit einer Singulettstruktur zu vWF mit einer Satellitenstruktur umsetzt und in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors DFP oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂ aktiv ist, sowie ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Multimerase.



AT 404 359 B



Die Erfindung betrifft eine Präparation enthaltend eine von Willebrand-Faktor-Protease, ein Verfahren für ihre Herstellung sowie ein Verfahren zur Herstellung von von Willebrand-Faktor mit Satellitenstruktur.

Von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, welches in Plasma in einer Reihe von Multimeren der Größe von etwa 500 bis 20 000 Kodalton zirkuliert. Die multimeren Formen von vWF setzen sich aus 250 kD Polypeptid-Untereinheiten zusammen, welche über Disulfidbrücken aneinander gebunden sind. vWF spielt eine Rolle bei der Bindung von Blutplättchen an das Subendothelium einer beschädigten Gefäßwand, wobei nur die größten Multimere auch haemostatische Aktivität zeigen. Es wird angenommen, daß die Endothelzellen große polymere Formen von vWF sekretieren und daß diejenigen Formen von vWF, welche ein kleineres Molekulargewicht aufweisen (low molecular weight vWF, LMW), durch proteolytische Spaltungen entstanden sind.

Die Multimeren mit großen Molekülmassen werden in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert und nach Stimulation freigesetzt.

Der vWF kann den Blutgerinnungsfaktor VIII binden und bildet so den Faktor VIII-Komplex oder Faktor VIII:C/vWF-Komplex, welcher den Faktor VIII:C als stabilisiertes Protein enthält. Ein vWF-Mangel führt unweigerlich auch zu einer Reduktion der Faktor VIII:C-Konzentration im Blut, da der Stabilisierungseffekt des vWF ausbleibt.

Der proteolytische Abbau von vWF ist ein physiologischer Prozeß in gesunden Personen, kann aber in Patienten mit von Willebrand-Disease (vWD) vom Typ 2A erhöht sein, was dazu führt, daß bei diesen Patienten die vWF-Multimere mit den größten Molekülmassen fehlen.

Ein kleiner Teil des vWF im normalen Plasma liegt als 189-, 176- und 140- kD-Fragmente vor, welche aus dem proteolytischen Abbau von vWF in vivo entstanden sind, wobei das 140 kD-Fragment von der N-terminalen Region und das 176 kD-Fragment von der C-terminalen Region der Untereinheit stammen. LMW-Formen von vWF wurden aus normalem menschlichen Plasma isoliert und nach Disulfid-Reduktion einer SDS-PAGE unterzogen. Der unüblich hohe Anteil von vWF-Fragmenten ist konsistent mit der Ansicht, daß die LMW-Formen des vWF teilweise oder größtenteils von großen Multimeren durch proteolytischen Abbau entstanden sind.

Die Infusion von 1-Desamino-8-D-arginin-Vasopressin in gesunden Personen führte zum Auftreten von Multimeren mit großen Molekülmassen im Plasma, welche im Anschluß sehr schnell wieder durch proteolytischen Abbau degradiert wurden. Bei erworbener vW-Krankheit (vWD), die mit dem myeloproliferativen Syndrom assoziiert ist, wurde ebenfalls ein Fehlen von großen vWF-Multimeren und ein erhöhter Level von proteolytischen Fragmenten beobachtet, was ebenfalls auf eine erhöhte Proteolyse in vivo hindeutet. Ungewohnt große molekulare Formen von vWF wurden in Patienten mit thrombotischer thrombocytopathischer Purpura (TTP) gefunden; diese großen Multimere verschwanden nach Transfusion mit normalem frisch gefrorenem Plasma. Es war zwar evident, daß ein oder mehrere proteolytische Enzyme in die physiologische Regulierung der polymeren Größe von vWF im zirkulierenden Blut involviert sind und daß diese auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von vWF-Abnormalitäten in einigen Patienten mit vererbten oder erworbenen Störungen der Haemostase spielen; das für die vWF-Proteolyse im normalen menschlichen Plasma zuständige proteolytische Enzym wurde bisher aber noch nicht identifiziert.

Es wurde zwar von mehreren Proteasen gezeigt, daß sie in der Lage sind, vWF derart zu spalten, daß dessen Bindungsaaffinität für Blutplättchen verlorengeht; jedoch ergab die Behandlung von vWF mit diesen Proteasen jeweils andere Spaltungsprodukte als die aus der in vivo-Spaltung hervorgegangenen Fragmente.

So ist z.B. Plasmin in der Lage, einige Peptidbindungen im vWF zu spalten, jedoch bleibt eine hochmolekulare Kernregion mit rund 70 % der Blutplättchen-agglutinierenden Aktivität (bestimmt als Ristocetin-Cofaktor) erhalten. Ein 34 kD-Peptid wurde vom N-Terminus einzelner vWF-Untereinheiten in einer frühen Stufe bei der Behandlung mit Plasmin abgespalten. Epitop-Mapping von Plasmin-induzierten Fragmenten zeigte deutlich, daß diese Fragmente aus den Bereichen der vWF-Untereinheit entstanden sind, welche verschieden von denjenigen Fragmenten sind, die in zirkulierendem Plasma vorhanden sind.

Auch für pankreatische Elastase aus Schwein und verschiedene Serinproteasen aus menschlichen Leukozyten konnte gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, vWF proteolytisch derart zu verdauen, daß die großen Multimere verlorengehen. Wiederum konnte durch Epitop-Mapping der Abbauprodukte gezeigt werden, daß auch diese Fragmente von denjenigen in Normalplasma und in vWD Typ 2A verschieden waren. Darüberhinaus zeigte sich, daß die vWF-Multimeren-Muster in Plasmaproben von Patienten mit extrem hohen oder niedrigen Neutrophil-Zählungen von denjenigen im normalen menschlichen Plasma nicht erheblich verschieden waren.

Neben den erwähnten Serinproteasen konnte auch für eine Calpainähnliche Protease aus menschlichen Blutplättchen gezeigt werden, daß sie in der Lage war, große vWF-Multimere abzubauen.

Weiters konnte durch Analyse der zirkulierenden vWF-Fragmente gezeigt werden, daß die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Tyr842 und Met843 in der vWF-Untereinheit von Patienten mit vWD vom

Typ 2A gespalten wird; eine Spaltstelle, die eine Calpainähnliche Spezifität indiziert. Demgegenüber konnte auch gezeigt werden, daß Calpaine aus Schweine-Erythrozyten oder aus Schweinenieren nicht die in vivo erzeugten vWF-Fragmente produzieren konnten.

Rekombinanter vWF (rvWF) kann in CHO-Zellen hergestellt werden, beispielsweise gemäß FEBS Letter 5 375, 259-262 (1995). Der auf diese Art gewonnene rvWF liegt als reifer vWF vor und weist eine Singulett-Struktur auf, d.h. er unterscheidet sich von dem plasmatischen vWF, welcher bei der Untersuchung in 2 %igen SDS-Agarosegelen stets in einer charakteristischen Satellitenstruktur vorliegt.

In der WO 96/10584 ist beschrieben, daß der rvWF aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht, die auch nach dem Reinigen und Behandeln zur Inaktivierung von Viren noch erhalten 10 bleibt. Die intakte Struktur des rvWF ist definiert durch das Ergebnis der elektrophoretischen Analyse von Multimerenbanden in Abwesenheit von Satellitenbanden.

Um aus dem r-vWF mit Singulett-Struktur eine r-vWF-Präparation mit einer dem plasmatischen vWF entsprechenden Struktur herzustellen, ist daher eine Behandlung mit einer physiologischen vWF-Proteaseaktivität notwendig.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher das zur-Verfügungstellen einer Enzymaktivität, welche in der Lage ist, vWF in physiologischer Weise proteolytisch zu prozessieren und gegebenenfalls abzubauen, bzw. das Bereitstellen einer Präparation, welche eine derartige Enzymaktivität umfaßt.

Erfindungsgemäß gelöst wird diese Aufgabe durch eine Zusammensetzung enthaltend eine gemäß der vorliegenden Beschreibung gereinigte Enzymaktivität, welche aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber 20 von Willebrand-Faktor-Multimeren als "Multimerase" bezeichnet wird, und die folgenden Eigenschaften aufweist:

- 25 a) sie besitzt eine mittelbare bzw. unmittelbare proteolytische Aktivität und setzt vWF mit einer Singulettstruktur zu vWF mit einer Satellitenstruktur um,
- b) sie ist aktiv in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors Di-isopropylfluorophosphat (DFP) oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂.

Eigenschaft a) kann mittels eines einfachen Tests durch Behandeln eines rekombinanten vWF mit Singulettstruktur mit der Multimerase bestimmt werden, welcher in den Beispielen näher erläutert ist, und stellt eine für Proteasen völlig neue Eigenschaft dar, welche bislang einzigartig für die erfindungsgemäß Multimerase ist. Die Satellitenstruktur, beispielsweise die Triplettsstruktur, entspricht dem Bild der Multimeren nach elektrophoretischer Analyse von plasmatischem vWF, welches durch jeweils eine zentrale Bande und mehrere Satellitenbanden gekennzeichnet ist (vgl. Fig. 12 und 13).

30 "Mittelbar" bzw. "unmittelbar" soll indizieren, daß die erfindungsgemäß Multimerase eine direkte, ohne Aktivator medierte, proteolytische Aktivität aufweist bzw. über einen entsprechenden Aktivierungseffekt oder einen Vermittler zu einer verstärkten proteolytischen Aktivität beiträgt.

35 Die Multimerase weist vorzugsweise eine optimale proteolytische Aktivität bei einem pH im Bereich von 7 bis 10, vorzugsweise pH 7,5 bis 8,5, auf. Dieser optimale pH-Bereich hängt jedoch stark von dem (Ionen-) Milieu ab, in dem die Reaktion durchgeführt wird.

40 Bevorzugterweise wird die Multimerase in einer Fraktion zur Verfügung gestellt, die nach Gelfiltration einer Plasma- oder Serumfraktion entsprechend dem Molekulargewicht von mehr als 200 kD, vorzugsweise um 300 kD, erhalten wird.

Bevorzugterweise wird die Multimerase nach erfindungsgemäßer Aufreinigung gegenüber Plasma in mindestens 1000-fach, vorzugsweise in mindestens 10 000-fach, angereicherter Form zur Verfügung gestellt.

45 Vorzugsweise weist die gereinigte Multimerase eine spezifische Aktivität von mindestens 10 E/mg Protein in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors auf. Eine Einheit ist als jene Enzymaktivität definiert, die in einem Milliliter humanem Normalplasma enthalten ist bzw. gesteuert werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß die Multimerase in Gegenwart von bzw. nach Inkubation mit zweiwertigen Metallionen, wie Erdalkali-Ionen, insbesondere Ba²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺, besonders aktiv ist und deren Aktivität durch Scherkräfte, reduzierte Ionenstärke oder chaotropen Mittel weiter erhöht werden kann.

50 Die Aktivität der Multimerase wird vor allem dann generiert, wenn die Ionenstärke des Milieus auf unter die physiologische Ionenstärke herabgesetzt wird, insbesondere entsprechend einer Konzentration von weniger als 15 mM Tris. Die Scherkräfte, welche beim Durchströmen einer Kapillaren, beim Rühren in Behältern oder beim Durchtritt durch eine Düse oder generell durch mechanische Beanspruchung der Multimerase bzw. deren Substrat wirken können, wesentlich zur erhöhten Aktivität der Multimerase 55 beitragen. Die Wirkung der chaotropen Stoffe ist vermutlich auf die teilweise oder vollständige Veränderung der Tertiärstruktur eines Proteins zurückzuführen. Zu diesen Stoffen zählen Salze, wie Ammoniumsulfat, Calciumchlorid, Thiocyanate, aber auch Harnstoff und Guanidiniumchlorid.

Vorzugsweise weist die erfindungsgemäß Multimerase-Präparation eine verstärkte Aktivität gegenüber modifiziertem vWF, wie partiell denaturierten vWF oder vWF mit einer Konformationsänderung, auf.

Die erfindungsgemäße Multimerase kann durch das Unterlassen oder Stoppen der Aktivierung inhibiert werden. Als Inhibitor können daher Chelatbildner, wie EDTA, EGTA und Citrat eingesetzt werden, die auf das Metalloenzym inhibierend wirken. Die Aktivität der Multimerase kann aber auch durch vWF-Peptide entsprechend der Tyr842-Met843-Peptidsequenz inhibiert werden, welche die Bindungsstelle der Multimerase blockieren können. Ein Herabsetzen der Temperatur, beispielsweise durch Einfrieren der Multimerase enthaltenden Fraktion, führt ebenfalls zur Reduktion der Multimerase-Aktivität.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung der erfindungsgemäßen Multimerase aus Plasma, Serum oder einer Fraktion von Plasma oder Serum durch ein chromatographisches Verfahren, wobei die gereinigte Multimerase aus den Fraktionen gewonnen wird, in denen die proteolytische Aktivität zur Inaktivierung von vWF in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors, vorzugsweise Aprotinin, gefunden wird.

Zum Nachweis der Multimerase-Aktivität dient ein Verfahren, welches die folgenden Schritte umfaßt: Inkubieren einer Fraktion enthaltend die Multimerase mit einem vWF und Bestimmen der Umsetzungsrate des vWF. Die Fraktion ist beispielsweise eine Plasmaprobe oder eine Plasmafraktion bzw. eine Fraktion mit der angereicherten, gegebenenfalls gereinigten Multimerase. Diese wird mit einem vWF in Kontakt gebracht, der ein nativer humarer vWF, vorzugsweise mit einer Singulettstruktur, sein kann oder ein entsprechendes vWF-Fragment enthaltend die Tyr842-Met843-Peptidsequenz.

Die Inkubation wird vorzugsweise unter Bedingungen durchgeführt, die eine optimale Aktivität der Multimerase wie zuvor beschrieben, gewährleisten. Während der Inkubation, die vorzugsweise unter nahezu physiologischen Bedingungen vorgenommen wird, bei pH 7 bis 10, vorzugsweise pH 7,5 bis 8,5, 20 bis 40 °C, vorzugsweise etwa Raumtemperatur, wird der vWF umgesetzt, abgebaut bzw. inaktiviert und das Resultat der Reaktion bestimmbar. Detektiert werden beispielsweise vWF-Abbauprodukte und Fragmente, wie Multimere mit niederen Molekülmassen oder Satellitenbanden nach elektrophoretischer Analyse, oder die Veränderung der Aktivität des vWF.

Bevorzugte chromatographische Reinigungsverfahren sind die Ionen austauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder Gelfiltration, wobei Kombinationen dieser Verfahren und Mehrfach-Chromatographien als besonders bevorzugt anzusehen sind.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Präparation mit einer gegenüber Plasma zumindest 1000-fach, vorzugsweise 10 000-fach, angereicherten Multimerase.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines vWF mit einer Satellitenstruktur durch Inkubieren eines vWF mit einer Singulettstruktur mit einer erfindungsgemäßen Multimerase, wodurch ein vWF mit einer Satellitenstruktur erhalten wird und der vWF gewonnen wird.

Das Verfahren wird vorzugsweise unter nahezu physiologischen Bedingungen durchgeführt. Beispielsweise erfolgt die Umwandlung des vWF bei einem pH im Bereich von 7 bis 10, vorzugsweise 7,5 bis 8,5 und bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C, vorzugsweise bei etwa Raumtemperatur, für einen Zeitraum, der zur Bildung von Satellitenbanden ausreicht, ohne die Aktivität des vWF wesentlich zu beeinflussen.

Für diese Herstellung des vWF mit Satellitenstruktur wird vorzugsweise eine Multimerase eingesetzt, die wie vorher beschrieben eine optimale Aktivität unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise durch Vorinkubation mit Metallionen, entwickelt. Die Dauer der Reaktion hängt auch vom Enzym/Substratverhältnis ab, welches im Bereich von 0,01:1 bis 100:1, vorzugsweise innerhalb eines Bereiches von 0,1:1 bis 10:1, gewählt wird, am meisten bevorzugt ist das physiologische Verhältnis von etwa 1:1 (Einheit pro Einheit). Die Reaktion wird entweder durch Zugabe eines geeigneten Inhibitors gestoppt, insbesondere eines Chelatbildners, oder durch Herabsetzen der Temperatur, beispielsweise durch Einfrieren der Reaktionslösung, oder durch Beenden der Reaktion, indem die Generierung der Aktivität unterlassen wird. Mittels elektrophoretischer Analyse kann der Verlauf der Reaktion kontrolliert werden und ein geeigneter Endpunkt bestimmt werden.

Diese Herstellung des vWF mit Satellitenstruktur kann sowohl *in vitro* in geeigneten Reaktionsmilieus erfolgen, aber auch *in vivo* oder *ex vivo*, beispielsweise bei der Expression von rvWF in einer Zellkultur oder extrakorporal, durchgeführt werden.

Das Inkubieren der Multimerase mit dem biologisch aktiven vWF wird vorzugsweise in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors durchgeführt, da durch die Inkubation in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors unspezifische, nicht unmittelbar auf die Multimerase zurückführende proteolytische Prozesse, welche durch die im Blut bzw. im Plasma vorhandenen Serinproteasen bedingt sind, vermieden werden können. Unter dem Schutz eines solchen Inhibitors kann die proteolytische Aktivität einer gegebenenfalls kontaminierten Serinprotease verhindert werden.

Die erfindungsgemäße Multimerase wird vorzugsweise also in einer Fraktion erhalten, die im wesentlichen frei ist von einer Serinprotease-Aktivität, entsprechend einer Plasminaktivität von weniger als die Nachweisgrenze eines Tests unter Verwendung eines spezifischen chromogenen Substrates, beispielsweise S2251 gemäß der EP-0 353 218.

5 Die vorliegende Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele sowie den Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen: Fig. 1: die vWF-Aufreinigung; Fig. 2: den Abbau von vWF durch kontaminierende Proteasen; Fig. 3: den Effekt von Salz und Harnstoff auf die vWF-Spaltung; Fig. 4: den Abbau von vWF durch verschiedene Blutkomponenten; Fig. 5: die Reinigung der Proteine aus Plasma; Fig. 6: die Chromatographie der Protease auf Sephadryl S-300 HR; Fig. 7: SDS-PAGE der nach der Sephadryl S-300 HR-Chromatographie erhaltenen Fraktionen; Fig. 8: den Einfluß von Metallionen und pH auf die Aktivität der vWF-spaltenden Protease; Fig. 9: die Wirkung von Proteaseinhibitoren auf den vWF-Abbau; Fig. 10: SDS-PAGE der vWF-Abbauprodukte; Fig. 11: die Wirkung der vWF-Protease auf Fibrinogen, BSA, Collagen aus Kälberhäut und verdünntes Normalplasma; Fig. 12: den Abbau von vWF mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 13: den Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 14: den Abbau von vWF-Hochmultimeren und r-vWF mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 15: den Abbau von r-vWF mit Plasmin; Fig. 16: den Abbau von r-vWF mit Plasmin mit und ohne Inhibitoren; Fig. 17: den Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit Plasmin; und Fig. 18: die Inkubation von r-vWF in vWF-defizientem, humanem Plasma.

20 **Beispiele:**

Reinigung von vWF

25 vWF wurde durch Gelfiltration von menschlichem Kryopräzipitat aus 1 l Citratplasma auf einer 2,6 x 35 cm Sepharose CL-2B-Säule (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigt. Die Elution wurde mit 0,13 M Natriumchlorid, 0,01 M Citrat, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, vorgenommen. 6 ml-Fraktionen wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 24 ml/h gesammelt. vWF-Antigen wurde durch ELISA bestimmt, wobei ein polyclonales Kaninchen-Antiserum gegen menschlichen vWF (RAHu/FVIII, Fa. Nordic (Tillburg, Niederlande)), Peroxidase-markierte Kaninchen-anti-Mensch-vWF-Antikörper, monoklonale Maus-Antikörper gegen Kaninchen-IgG (M737) und der Kit für die Immunofärbung (K670) (alle von der Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)), gemäß den im Kit inkludierten Arbeitsvorschriften verwendet wurde.

Die Ergebnisse der vWF-Aufreinigung sind in Fig. 1 dargestellt: Dabei enthielten die Fraktionen 12 bis 20 vWF, welcher im wesentlichen frei von kontaminierenden Proteinen ist. Diese Fraktionen wurden als Substrat in der Bestimmung der vWF-Spaltungsaktivität (siehe unten) verwendet.

35 Es zeigte sich, daß der in diesen Fraktionen enthaltende vWF sehr stabil war; so wurde selbst nach 24-stündiger Dialyse-Inkubation bei 37 °C (in Abwesenheit von Inhibitoren) ein identes Multimeren-Muster wie mit den unbehandelten Fraktionen erhalten, und zwar sowohl bei der 24-stündigen Dialyse gegen 0,13 M Natriumchlorid, 0,01 M Citrat, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, als auch bei der 24-stündigen Dialyse gegen 1 M Harnstoff, 5mM Tris-HCl, pH 7,4. SDS-Agarosegele dieser Untersuchungen sind in Fig. 2 dargestellt.

40 Die nachfolgenden Fraktionen zeigten jedoch einen starken vWF-Abbau bei niedrigen Salzkonzentrationen in Anwesenheit von Harnstoff.

Effekt der Salz- und Harnstoffkonzentrationen auf die Spaltung von vWF:

45 Aliquots der Fraktion Nr. 29 aus der Sepharose CL-2B-Säule wurden gegen eine 5 mM Tris-HCl (pH7,4)-Lösung, welche unterschiedliche Salzkonzentrationen aufwies, in An- oder Abwesenheit von Harnstoff dialysiert, wobei keine Calciumionen zugegeben wurden. Parallel Untersuchungen wurden mit weiteren Aliquots der Fraktion 29 durchgeführt, welche vor der Dialyse einer 5-minütigen Inkubation mit 50 1mM DFP unterzogen wurden. Aus Fig. 3 kann ersehen werden, daß die großen vWF-Multimere nach der Dialyse verschwanden, wenn kein Natriumchlorid vorhanden war. Weiters konnte der vWF-Abbau durch 1 M Harnstoff selbst bei physiologischen Salzkonzentrationen deutlich gesteigert werden. Die Kombination von niedriger Salzkonzentration mit 1 M Harnstoff führte zum vollständigen Abbau von vWF. Eine Vorinkubation mit 1 mM DFP, eines starken Serinprotease-Inhibitors, brachte identische Resultate. Für einen empfindlichen Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität wurde daher die Dialyse bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl als optimale Bedingungen gewählt.

Bestimmen der vWF-Spaltungsaktivität

Da der Abbau von vWF - wie erwähnt - sehr stark von den angewendeten Pufferbedingungen abhängig ist, wurden Enzym und Substrat an einer zirkulären Dialysemembran (Millipore VSWP; Durchmesser 25 mm; Firma Millipore (Beford, USA)) inkubiert, wobei die Oberfläche mit 50 ml Dialysepuffer inkubiert wurde. Das für das vorliegende Testsystem ausreichend optimierte Puffersystem umfaßte daher eine Dialyselösung mit 1 M Harnstoff in 5 mM Tris-HCl bei pH 8. Die volle Aktivierung der Protease wurde durch 5-minütige Vorinkubation bei 35 °C in 10 mM Bariumchlorid erreicht. In einem typischen Experiment wurden 50 µl aktivierter Proteaselösung und 100 µl Substratlösung vorsichtig auf eine Floating-Membran aufgebracht und in einem geschlossenen Röhrchen für 24 h in einem trockenen Ofen bei 37 °C inkubiert.

Proteasefreie Fraktionen von vWF von der Sepharose CL-2B-Säule wurden als Substratlösung verwendet, wobei die vWF-Konzentration in der Inkubationsmischung bei ungefähr 30 µg/ml lag. Die Reaktionsmischungen wurden dann anschließend von der Oberfläche der Membranfilter entfernt und einer SDS-Agarosegel-Elektrophorese unterzogen, um das Multimerenmuster von vWF zu untersuchen.

15 SDS-Agarosegel-Elektrophorese und Immunoblotting von unreduziertem vWF:

Dünnschichtagarose-Elektrophorese wurde unter Verwendung des diskontinuierlichen Puffersystems wie es von Ruggeri und Zimmermann beschrieben worden ist (Blood 57 (1981), 1140) durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurde jede Probe mit einem gleichen Volumen des SDS-enthaltenden Probenpuffers während 15 min bei 60 °C inkubiert. Die horizontale Elektrophorese selbst wurde in 1 %iger HGT(P)-Agarose (2 mm dick, 20 cm breit und 8,5 cm lang) für 17 h bei 16 °C in einem LKB-Multiphor-Apparat (Pharmacia-LKB) bei 80 V und 10 mA durchgeführt. Die Proteine wurden während 3 h bei 26 V und 1,4 A auf eine Nitrocellulosemembran (Firma Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)) elektrotransferiert, wobei eine Trans-Blot-Zelle von Bio-Rad mit einem Puffer enthaltend 0,04 % SDS und 0,05 M Phosphat, pH 7,4, verwendet wurde. vWF-Multimere wurden mittels Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen menschlichen vWF identifiziert (mittels Peroxidase-markiertem Kaninchen-anti-Human-vWF-Antikörper P226 der Firma Dako (Glostrup, Dänemark)).

30 SDS-PAGE:

5 %ige SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (Nature 227 (1970), 680) bereitet. Die Proteine wurden mittels 65 mM DTT während 15 min bei 60 °C reduziert. Nichtreduzierte und reduzierte chromatographische Fraktionen von der Sephadryl S-300 HR-Säule wurden in 3 mm dicken Gelen für 18 h bei 60 V elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Immunoblotting des reduzierten vWF:

Reduzierte Proben von ungeschnittenem und proteolytisch geschnittenem vWF wurden einer SDS-PAGE unterzogen und auf Nitrocellulose wie oben beschrieben elektrotransferiert. Zur Detektion der vWF-Fragmente wurde die Nitrocellulose mit einem Kaninchen-Antiserum gegen menschlichen vWF (RAHu/FVIII) inkubiert und anschließend mit Maus-Antikörpern gegen Kaninchen-IgG (M737; Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)) und den APAAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)-Reagens (K670 der Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)) gemäß Furlan et al. (PNAS 90 (1993), 7503) inkubiert.

45 Herstellung von Blutkomponenten welche auf die Anwesenheit der Protease untersucht werden:

Vollblut wurde von normalen Personen in ein Glasrörchen ohne den Zusatz von Antikoagulantien gewonnen. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die geronnene Blutprobe zweimal für 15 min bei 2500 g zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl 10 mM PPACK (Diphenylalanin-propyl-arginin-chloromethylketon; Fa. Bachem, Bubendorf (Schweiz)) zu 10 ml Serum gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -20 °C gefroren. Von derselben Person wurden 90 ml Blut in 10 ml 0,13 M Natriumcitrat in einer Plastikflasche gewonnen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 300 g wurden ungefähr 50 ml Plättchen-angereichertes Plasma (platelet rich plasma; PRP) gewonnen. Ein Aliquot von PRP wurde für 15 min bei 2500 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Plättchen-arme Plasma (platelet-poor plasma; PPP) wurde nochmals für 15 min 3000 g rezentrifugiert und bei -20 °C gefroren. Das Plättchensediment wurde in 0,9 % Natriumchlorid in 1/15 des ursprünglichen Volumens wieder aufgenommen und dreimal gefroren und wieder aufgetaut. Die lysierten Plättchen wurden für 15 min bei 3000 g zentrifugiert und der entstandene Überstand

und das Sediment bei -20 °C gefroren. Ein gefrorenes Aliquot des PPP wurde langsam aufgetaut, um Kryopräzipitat zu erhalten. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei -5 °C und 3000 g wurden der Überstand und das Kryopräzipitat, welches in 1/15 des ursprünglichen Volumens in 0,9 %igem Natriumchlorid aufgenommen worden war, bei -20 °C gefroren. Ein weiteres Aliquot von PPP wurde in ein Glasröhrenchen 5 transferiert, mit 1/40 Volumen einer 1 M Calciumchloridlösung gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Fibringerinnsels und einer 15 minütigen Zentrifugation bei 3000 g wurde PPACK zu einer Endkonzentration von 25 μ M zugegeben und das defibrinierte Plasma bei -20 °C gefroren. Die gefrorenen Proben wurden vor dem Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität jeweils für 10 min bei 37 °C inkubiert.

10 **Untersuchung von den hergestellten Blutkomponenten auf Protease-Aktivität:**

15 10 μ l 10 mM PPACK und 10 μ l 0,55 M Calciumchlorid wurden jeweils 200 μ l Serum, PPP, Kryopräzipitat-freiem PPP, defibriniertem PPP sowie 15-fach konzentriertem Kryopräzipitat und lysierten Plättchen zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 10 μ l-Aliquots mit 40 μ l vWF-Lösung gemischt, über Nacht bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) dialysiert und der proteolytische Abbau von vWF durch SDS-Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

20 Es stellte sich heraus, daß die Proteaseaktivität in PPP deutlich höher war als im Überstand oder im Sediment von lysierten Plättchen, welche durch 15-fache Ankonzentrierung von PRP erhalten worden waren (siehe Fig. 4). Die Proteaseaktivität konnte durch Defibrinierung nicht beeinträchtigt werden und wurde teilweise auch im Kryopräzipitat von PPP erhalten; das Kryopräzipitat, welches dem 15-fach konzentrierten PPP entsprach, enthielt eine erhebliche Aktivität, wohingegen das nicht-konzentrierte Kryopräzipitat deutlich weniger Protease als die entsprechende Menge an PPP enthielt. Es konnte kein prinzipieller Unterschied in 25 der Proteaseaktivität aus Citrat-PPP und in Serum aus nichtkoaguliertem Blut festgestellt werden.

26 **Reinigung der Protease aus Plasma:**

30 Fibrinogen wurde vor den chromatographischen Verfahrensschritten vom Plasma entfernt, da diese Reinigungsschritte möglicherweise geeignet sind, die Aktivierung der Gerinnungskaskade zu induzieren. Versuche zeigten auch, daß die Aktivität der vWF-abbauenden Protease nicht oder nicht wesentlich durch 35 Defibrination des Plasmas oder der Plasmafraktion, DFP oder PPACK beeinflußt wurde.

40 450 ml Blut von gesunden Personen wurde in 63 ml Citrat/Phosphat/Dextrose/Adenin (CPD-A₁)-Lösung auf einer Wiege gesammelt. Nach zwei Zentrifugationen für 15 min bei 20 °C und 2500 g wurde 1 M Calciumchlorid zu einer Endkonzentration von 25 mM zugegeben und das recalzifizierte PPP wurde für 30 min bei 37 °C gerührt. Nach Entfernung des Fibrinclots durch Zentrifugation wurden PPACK und DFP auf 45 Endkonzentrationen von 5 μ M bzw. 2 μ M dem erhaltenen Serum zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um aktivierte Gerinnungsenzyme zu inhibieren. Weiters wurde das Serum gegen einen Äquilibrierungspuffer mit 1 M Natriumchlorid und 0,05 M Tris-HCl bei pH 7,4 dialysiert. 50 ml Aliquots wurden bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

45 Die Protease konnte aus dem defibrinierten Normalplasma als Ausgangsmaterial zunächst auf Cu²⁺-geladener chelatierender Sepharose (1,6 x 22 cm; Fa. Pharmacia LKB) unter Verwendung von schrittweiser Elution mit Äquilibrierungspuffer mit steigender Glycinkonzentration gereinigt werden. Protease enthaltende Fraktionen (siehe waagrechter Strich in Fig. 5A) wurden gepoolt (dieser Pool enthielt 14,7 % des 50 ursprünglichen Proteins), gegen 0,6 M (NH₄)₂SO₄/0,02 M Tris-HCl, pH 7,0, dialysiert und auf Butylsepharose (1,6 x 27 cm; Firma Pharmacia LKB) aufgebracht, wobei die meisten verunreinigenden Proteine durch schrittweise Elution bei niedriger (NH₄)₂SO₄-Konzentration entfernt werden konnten. Proteolytisch aktive Fraktionen (siehe Querstrich in Fig. 5B) von zwei Butylsepharose-Säulen wurden gepoolt (dieser Pool enthielt nahezu die gesamte Proteaseaktivität, jedoch nur 0,75 % des ursprünglichen Proteins), gegen ein 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert, in 5 ml destilliertem Wasser aufgenommen und auf eine Sephadryl S-300 HR-Säule (2,6 x 90 cm; Firma Pharmacia LKB), welche mit 0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, äquilibriert worden ist, aufgebracht (siehe Fig. 5C; die Fraktionen unter dem Querschnitt enthielten die gesamte Proteaseaktivität, jedoch nur 0,08 % des ursprünglichen Gesamtproteins).

55 Um die Auflösung der Gelfiltration zu verbessern, wurde eine lange Säule durch Schließen des ersten Elutionszyklus simuliert, indem die eluierten Proteine in dieselbe Säule zurückgeführt und in einem zweiten Zyklus gesammelt wurden. Wiederum wurden die aktiven Fraktionen gepoolt, gegen 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert und in 3 ml destilliertem Wasser wieder aufgelöst und einer weiteren Gelfiltration auf einer Sephadryl S-300 HR-Säule unterzogen.

Bei dieser Gelfiltration wurden die ersten zwei Zyklen geschlossen und die Fraktionen beim dritten Zyklus gesammelt. In all diesen geschilderten chromatographischen Verfahren wurden 6 ml-Fraktionen bei einer Flußrate von 60 ml/h gesammelt. Die Protease enthaltenden Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt und zeigen die Elution des UV-absorbierenden Materials (Fig.

5 6A) und der Proteaseaktivität (Fig. 6B). Der Peak der Proteaseaktivität (Fraktionen 9 bis 17) enthielt nur 0,009 % des ursprünglichen Serumproteins. Daher wurde ein Reinigungsfaktor von ungefähr 10 000 erreicht. Dennoch enthielt die erhaltene Proteasepräparation noch wesentliche Mengen an kontaminierenden Proteinen (siehe Fig. 7). Der Peak der Proteaseaktivität (Fraktionen 11 bis 15) trat zusammen mit einer Proteinbande im unreduzierten Gel mit einem Molekulargewicht von rund 300 kD auf, welche mit mehreren 10 Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich zwischen 130 und 450 kD auftrat (Hauptbanden mit M_r von 450, 200, 180 und 130 kD).

Aminosäurezusammensetzung und Sequenzanalyse:

15 Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung und der Aminosäuresequenz wurde die unreduzierte Peak-Fraktion der Protease und die reduzierten vWF-Fragmente gegen 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert und in 1/50 des ursprünglichen Volumens vor der SDS-PAGE wieder aufgelöst. Die HMW-Proteinbanden wurden vom Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (BioRad) während 6 h bei 26 V und 0,4 A elektrotransferiert, wobei 0,05 % SDS, 10 % Methanol, 0,05 M Borsäure, pH 9,0, als Transferpuffer verwendet wurden. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Coomassie-Blau in 40 % Methanol gefärbt, mit 40 % Methanol und 10 % Eisessig entfärbt und luftgetrocknet. Die ausgeschnittenen Banden wurden auf das Blot-Cartridge des Applied Biosystems Model 477A-Sequenators transferiert, der mit einer Online-HPLC ausgestattet war, um die Phenylthiohydantoinderivate zu analysieren. Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzungen wurden die Proteinbanden in der Gasphase über 6 N HCl für 22 h bei 110 °C 20 hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden von der PVDF-Membran mit 70 % 0,1 N HCl/30 % Methanol extrahiert und durch HPLC als Phenylthiocarbamyldeivate bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung der nicht-reduzierten Proteinbande, welche aus der Sephadryl S-300 HR-Säule zusammen mit der Proteaseaktivität eluiert wurde, ist in Tabelle 1 angeführt:

25

30

Tabelle 1

| Aminosäure | Reste pro 1000 Reste |
|------------|----------------------|
| Asp + Asn | 99,4 |
| Thr | 59,4 |
| Ser | 63,3 |
| Glu + Gln | 150,2 |
| Pro | 65,5 |
| Gly | 75,9 |
| Ala | 86,5 |
| Val | 70,7 |
| Ile | 32,9 |
| Leu | 101,7 |
| Tyr | 30,6 |
| Phe | 41,7 |
| His | 22,4 |
| Lys | 41,6 |
| Arg | 49,3 |

50

Einfluß von Metallionen und pH auf die Aktivität der vWF-spaltenden Protease:

95 μ l Aliquots der gereinigten Protease wurden für 15 min bei 37 °C mit 5 μ l 0,2 M Lösungen der folgenden Salze vorinkubiert: $ZnCl_2$, $CuSO_4$, $Cd(CH_3COO)_2$, $CoSO_4$, $NiCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ und 55 $BaCl_2$. Anschließend wurden 50 μ l des gereinigten vWF jedem Aliquot zugegeben und die Inkubationsmischungen auf Floating-Membranfilter transferiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4, wurden die Proben von den Filtern entfernt und einer SDS-Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

Es zeigte sich, daß die Protease durch Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} oder Mn^{2+} nicht aktiviert werden konnte. Eine nur mäßige Aktivierung zeigte sich mit Mg^{2+} ; eine deutliche Aktivierung konnte jedoch mit Ca^{2+} , Sr^{2+} , und insbesondere mit Ba^{2+} erreicht werden (siehe Fig. 8A).

Eine längere Vorinkubation mit Calcium, Strontium und Barium führte zu einem Verlust an Proteaseaktivität, sogar bei physiologischen Salzkonzentrationen und in Abwesenheit von Harnstoff, was möglicherweise auf Selbstverdauungsprozesse der Protease zurückzuführen sein könnte. Bei Abwesenheit dieser Ionen hält sich die Protease recht stabil in Lösung, was eine mehrtägige chromatographische Aufreinigung des Enzyms bei Raumtemperatur ermöglichte.

pH-Optima der Protease nach Aktivierung durch Calcium und Barium wurden bestimmt, indem die Protease mit 10 mM Calciumchlorid oder 10 mM Bariumchlorid vorinkubiert wurde, und mit vWF während der Dialyse im Harnstoff Tris-HCl-Puffer inkubiert wurden, wobei mehrere Puffer mit pH-Werten im Bereich zwischen 6 und 11 verwendet wurden. Das Multimeren-Muster von vWF in den dialysierten Proben wurde mit SDS-Agarose-Elektrophorese analysiert.

Das pH-Optimum des vWF-Abbaus durch die Calcium-aktivierte Protease lag um 9 bis 10, wohingegen die höchste Aktivität der Barium-aktivierten Protease bei ungefähr pH 8 lag (siehe Fig. 8B).

Die Experimente zur Bestimmung der vWF-abbauenden Proteaseaktivität wurden daher stets bei pH 8 nach einer Inkubation mit 10 mM Bariumchlorid durchgeführt.

Der Effekt von Protease-Inhibitoren auf den vWF-Abbau:

Gereinigte Protease wurde für 5 min bei 37 °C mit 10 mM Bariumchlorid reaktiviert und dann für 15 min bei 37 °C mit den folgenden Protease-Inhibitoren inkubiert: EDTA (Endkonzentration 10 mM), EGTA (10 mM), Na_3 -Citrat (10 mM), Iodacetamid (IAA, 10 mM), N-Ethylmaleimid (NEM; 10 mM), DFP (1 mM), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 1 mM), N- α -p-Tosyl-L-lysin-chloromethylketon (TLCK; 1 mM), N- α -p-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK (1 mM), Leupeptin (0,01 mM) und Aprotinin (0,01 mM).

Weiters wurden die folgenden Carbobenzoyloxy-(Z)-peptidyl-diazomethylketon-Inhibitoren getestet (alle bei einer Endkonzentration von 0,1 mM während Vorinkubierung mit der Barium-aktivierten Protease): Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, Z-Val-Val-Tyr-CHN₂, Z-Phe-Ala-CHN₂, Z-Phe(I)-Ala-CHN₂, Z-Tyr-Ala-CHN₂ und Z-Phe-Phe-CHN₂.

Nach der Vorinkubation wurden 100 μ l Aliquots der Enzym-Inhibitormischungen 50 μ l gereinigter vWF-Lösung zugegeben und die Mischungen während 24 h bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, bei pH 7,4, dialysiert. Der Abbau von vWF wurde mittels SDS-Agarose-Elektrophorese und Immunoblotting getestet (siehe Fig. 9A).

Die chelatierenden Agentien EDTA und EGTA konnten die Bariumvorinkubierte Protease komplett inhibieren, wohingegen mit Citrat nur eine Teilinhibition erreicht werden konnte. Eine 15-minütige Vorinkubation mit den Sulfhydrylenzym-Inhibitoren IAA und NEM konnte die Protease nicht inhibieren. Weiters zeigte die erfindungsgemäße Protease keine Inhibition durch die Serinprotease-Inhibitoren DFP, PMSF und Aprotinin oder durch die Serin/Sulfhydrylprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und Leupeptin.

In weiteren Experimenten, bei welchen dieselben Inhibitoren auch in der Dialyselösung vorhanden waren, wurden dieselben Ergebnisse erzielt, mit einer Ausnahme: mit NEM konnte eine teilweise Protease-Inhibition erreicht werden.

Es scheint daher die Protease sehr langsam durch NEM inhibiert zu werden, jedoch nicht durch IAA.

Unter den Peptidyl-Diazomethylketon-Inhibitoren, welche getestet wurden, konnten nur Z-Phe-Phe-CHN₂ und Z-Val-Val-Tyr-CHN₂ den proteolytischen Abbau von vWF beeinträchtigen (siehe Fig. 9B).

Polypeptid-Untereinheiten des abgebauten vWF und anderen Proteinen:

Gereinigter vWF (50 μ l) wurde mit verschiedenen Verdünnungen der Protease (100 μ l), welche mit 10 mM Bariumchlorid für 5 min bei 37 °C vorinkubiert worden war, gemischt und die Mischungen während 24 h bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert. Die resultierenden Verdaue wurden einer SDS-PAGE unterzogen nachdem sie mit DTT reduziert worden waren. Immunodetektion der reduzierten vWF-Fragmente wurde unter Verwendung des APAAP-Kits durchgeführt.

Der Abbau der intakten vWF-Untereinheit wurde begleitet durch das Auftreten von steigenden Mengen von zwei Fragmenten mit einem Molekulargewicht von 170 und 140 kD, wie durch Immunoblots von reduzierter SDS-PAGE gezeigt werden konnte (siehe Fig. 10).

In parallelen Experimenten wurden drei andere Proteine mit der gereinigten Protease inkubiert, nämlich jeweils 50 μ l-Lösungen von menschlichem Fibrinogen (0,4 mg/ml), BSA (0,2 mg/ml) oder Collagen aus Kalbshaut (0,4 mg/ml), welche mit jeweils 100 μ l der unverdünnten Protease, welche mit Bariumionen

vorinkubiert wurden, inkubiert, wobei die Inkubationsmischungen für 24 h bei 37°C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, bei pH 8,0 dialysiert worden sind. Weiters wurde citriertes menschliches Normalplasma (Verdünnung 1 : 100) zusammen mit der erfindungsgemäßen Protease-Präparation dialysiert. In Kontrollexperimenten wurde die Protease durch 0,15 M Natriumchlorid/0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, ersetzt. Nach der 5 Dialyse wurden die Proteine mit DTT reduziert und auf eine SDS-PAGE aufgebracht. Coomassie-Blau-Färbung wurde zur Detektion der Polypeptidketten verwendet.

Es zeigte sich, daß unter vWF-abbauenden Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Protease-Präparation kein Abbau von menschlichem Fibrinogen, BSA oder Collagen aus Kälberhaut beobachtet werden konnte (siehe Fig. 11). Die reduzierte SDS-PAGE zeigte unveränderte Untereinheitsketten dieser 10 Proteine, welche als potentielle Substrate verwendet worden sind, was darauf hindeutet, daß die erfindungsgemäße Protease eine hohe Spezifität für vWF aufweist.

Aminosäure-Analyse und Aminosäure-Sequenz von vWF und dessen Abbauprodukten:

15 Alle drei elektrophoretischen Banden, welche in Fig. 10 gezeigt sind, nämlich die 250-, 170- und 140-kD-Bande, wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und einer Analyse der Aminosäurezusammensetzung und der Aminosäuresequenz unterzogen. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt und zeigten gute Übereinstimmung zwischen der Aminosäurezusammensetzung dieser drei Polypeptidbanden und den theoretischen Werten, welche ausgehend von der intakten vWF-Untereinheit, dem C-terminale Fragment 20 843-2050 und dem N-terminale Fragment 1-842 berechnet worden sind; siehe dazu EP-0 197 592. Die N-terminale Aminosäuresequenz zu einer der 250- und 140-kD-Banden war Ser-Leu-Ser-X-Arg; diese Sequenz stimmt mit der N-terminale Sequenz der intakten vWF-Untereinheit überein. Die Analyse des größeren Abbauproduktes mit der Molmasse 170 kD ergab eine N-terminale Sequenz von Met-Val-ThrGly-Asn, welche mit den Aminosäureresten 843-847 in der intakten vWF-Untereinheit übereinstimmt. Diese Daten 25 deuten darauf hin, daß die gereinigte Protease die Peptidbindung Tyr842 mit 843 spaltet.

30

35

40

45

50

55

AT 404 359 B

Tabelle 2

| Aminosäure | $M_p \sim 250 \text{ kD}$ | vWF 1:2050 | $M_p \sim 170 \text{ kD}$ | vWF 843:2050 | $M_p \sim 140 \text{ kD}$ | vWF 1:842 |
|------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| Asp + Asn | 173 | 187 | 102 | 108 | 77 | 79 |
| Thr | 118 | 116 | 70 | 78 | 39 | 38 |
| Ser | 131 | 141 | 78 | 80 | 55 | 61 |
| Glu + Gln | 249 | 237 | 152 | 139 | 104 | 98 |
| Pro | 139 | 136 | 85 | 86 | 54 | 50 |
| Gly | 152 | 137 | 117 | 86 | 76 | 51 |
| Ala | 110 | 104 | 67 | 60 | 50 | 44 |
| Val | 171 | 184 | 87 | 103 | 66 | 81 |
| Ile | 75 | 78 | 41 | 44 | 30 | 34 |
| Leu | 163 | 156 | 86 | 83 | 73 | 73 |
| Tyr | 48 | 49 | 18 | 22 | 21 | 27 |
| Phc | 58 | 56 | 33 | 32 | 25 | 24 |
| His | 53 | 52 | 28 | 31 | 19 | 21 |
| Lys | 87 | 88 | 45 | 47 | 39 | 41 |
| Arg | 95 | 101 | 49 | 58 | 38 | 43 |

55 Proteolytische Fragmentierung von rekombinantem vWF:

Rekombinanter vWF-Faktor (r-vWF), hergestellt gemäß FEBS-Letters 375, 259-262 (1995), mit einer Konzentration von 104 E (Ag)/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8.3, wurde wie oben beschrieben, mit der

erfindungsgemäßen vWF-Protease-Präparation inkubiert. Es zeigte sich bereits nach 3 h ein Verlust der höchsten Multimere unter Bildung von den plasmatischen vWF-ähnlichen Satellitenbanden. Nach 20 h waren keine Oligo- und Multimere mehr nachweisbar (siehe Fig. 12A).

Die erfindungsgemäß hergestellte Präparation mit der vWF-spezifischen Protease wies nach Kupferchelat-Affinitäts-Chromatographie noch eine deutlich meßbare Plasminaktivität auf (0,2 E/ml; wurde ermittelt, indem 50 µl-Probe oder Standard (humanes Plasmin der Firma Chromogenics mit 19,3 E/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3) 1 min bei 37°C vorgewärmt und mit 200 µl chromogenem Substrat PL1, Immuno AG (D-Cyclohexylglycyl-L-Alanyl-L-Arginin-p-Nitroanilid, 1 mM in TBS-Puffer, pH 8,3) versetzt wird, worauf die Kinetik der Freisetzung von p-Nitroanilin bei 37°C bei 405 nm photometrisch gemessen wird). Es mußte daher ausgeschlossen werden, daß durch die Protease-Präparation ein Abbau der von Willebrand-Faktor-Multimere erfolgt, der auf das vorhandene Plasmin zurückzuführen und nicht Resultat der vWF-spezifischen Protease war.

Die Figuren 12B und 12C zeigen, daß rekombinanter vWF bei Inkubation mit der erfindungsgemäßen Protease in Gegenwart eines Plasmininhibitors (Aprotinin) und eines Proteaseinhibitors mit geringerer Spezifität für Plasmin, wie PPACK, ident abgebaut wird. Die Konzentration von Aprotinin und PPACK wurde so gewählt, daß mit chromogenem Substrat keine Proteaseaktivität von Plasmin nachgewiesen werden konnte.

Bei der Inkubation von Kryopräzipitat mit vWF-Protease (Fig. 13A) konnte über die Zeit ebenso wie beim rekombinanten vWF ein Verlust der Multimere beobachtet werden. Die Satellitenbanden zeigten bereits nach kurzer Inkubation eine Verstärkung. Durch Zusatz der Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Fig. 13B und PPACK, Fig. 13C) konnte der Abbau nicht verhindert aber verlangsamt werden. Wenn anstatt des Kryopräzipitates (Laborpräparation 10 E (Ag)/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3) eine dafür hergestellte Präparation der höchsten vWF-Multimere eingesetzt wurde (siehe Fig. 14A), konnte mit der erfindungsgemäßen vWF-Protease ein deutlicher Shift zu niedrigen Multimeren unter Verstärkung der Satellitenbanden nachgewiesen werden. Mit Plasmin wurde bei Verdau über Nacht sowohl plasmatischer vWF als auch rekombinanter vWF überhaupt vollständig degradiert (siehe Fig. 14B und 14D). In diesem Experiment zeigte der Abbau des rekombinanten vWF mit der erfindungsgemäßen Protease, daß die entwickelten Satellitenbanden und die zentralen Banden dem plasmatischen vWF zwar sehr ähnlich, aber unschärfer waren (Fig. 14C).

Die Inkubation von r-vWF mit Plasmin (siehe Fig. 15; wobei Plasmin auf 0,2 E/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3, verdünnt und 1 : 1 mit der jeweiligen r-vWF-Präparation versetzt und bei 37°C inkubiert wird) in niedrigerer Konzentration, bezogen auf das vorhandene Substrat, zeigte in der kinetischen Untersuchung einen sukzessiven Abbau der Multimere über 29 h (siehe Fig. 15A). Ein Kontrollansatz ohne Protease beweist die sonst feststellbare Stabilität des r-vWF in Lösung (siehe Fig. 15C). Bei Reduktion der Plasminkonzentration auf 1 : 10 war der Abbau von r-vWF langsamer (Fig. 15B); dies konnte durch den Zusatz von Aprotinin (siehe Fig. 16B) und PPACK (siehe Fig. 16C) verhindert werden. Die Multimerenbilder zeigten über die Zeit (ca. 20 h) keine Veränderungen im Gegensatz zur Behandlung ohne Inhibitor (siehe Fig. 16A).

Der Kontrollversuch mit Kryopräzipitat (Fig. 17) zeigt wieder eine Reduktion der hohen Multimere bei Inkubation über 8 h, der durch Zusatz von Aprotinin oder PPACK verhindert werden konnte.

Es wurde weiters untersucht, ob ein proteolytischer Abbau von r-vWF durch Inkubation mit Humanplasma erfolgte (siehe Fig. 18). Dazu wurde die r-vWF-Präparation mit gleichen Volumsteilen eines vWF-defizienten Plasmas (siehe Fig. 18A) gemischt und 48 h inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeiten Proben gezogen wurden. Es konnte keine Veränderung des r-vWF über die Zeit nachgewiesen werden. Eine Kontrollpräparation, die Puffermedien über die selbe Zeit bei 37°C stehengelassen wurde, zeigte ebenso keine Veränderung der Struktur (siehe Fig. 8B).

Die Analyse des r-vWF und seiner proteolytischen Abbauprodukte erfolgte in 1 %igen und 2 %igen Agarosegelen ebenfalls nach der Methode von Ruggeri et al. (Blood 57 (1981), 1140-1143). Dabei wurden die vWF-Multimere durch eine immunenzymatische Färbung nach Aihara et al., (Thromb. Haemostas. 55 (1986), 263-267) sichtbar gemacht. Als Primär-Antikörper wurde ein Kaninchenanti-von Willebrand-Faktor-Antiserum (von der Fa. Dakopatts, Glostrup, Dänemark) verwendet, als sekundärer Antikörper diente ein alkalischer Phosphatase-konjugierter affinitätsgereinigter Ziegen-anti-Kaninchen IgG H + L-Antikörper (von der Fa. Axell Accurate Chemical and Scientific Corp., Westburg, N.Y.). Die Färbung der Proteinbande erfolgte mittels des Nitroblautetrazolium/bromchlor-indolyl-phosphat-Substratsystems.

55

Patentansprüche

1. Gereinigte Multimerase, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:

st der
20 h
erche-
nittelt,
3 mM
10 AG
uf die
nußte
aktor-
schen
näßen
riger
wurde
erden
o wie
eigten
1. 13B
t des
stellte
gsge-
änden
auch
iment
kelten
härfer
'uffer,
rd) in
chung
tease
n der
n den
bilder
(siehe
re bei
nplas-
vWF-
roben
Eine
benso
%igen
urden
as. 55
aktor-
te ein
· (von
bande

a) sie besitzt eine mittelbare bzw. unmittelbare proteolytische Aktivität und setzt von Willebrand-Faktor (vWF) mit einer Singulettstruktur zu vWF mit einer Satellitenstruktur um, und
b) sie ist aktiv in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors DFP oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂.

5 2. Multimerase nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Peptidbindung 842Tyr-843Met des vWF spalten kann.

10 3. Multimerase nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie in einer Fraktion detektiert werden kann, die nach Gelfiltration einer Plasma- oder Serumfraktion entsprechend dem Molekulargewicht von mehr als 200 kD erhalten wird.

15 4. Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine spezifische Aktivität von mindestens 10 E/mg Protein in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors aufweist.

20 5. Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ein pH-Optimum im Bereich von 7 bis 10 aufweist.

25 6. Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen, wie Erdalkaliumen, aktiv ist.

30 7. Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Aktivität aufweist, die durch Scherkräfte, reduzierte Ionenstärke oder chaotrope Mittel erhöht werden kann.

35 8. Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine verstärkte Aktivität gegenüber modifiziertem vWF, wie partiell denaturiertem vWF oder vWF mit einer Konformationsänderung, aufweist.

40 9. Verfahren zur Reinigung einer Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 aus Plasma, Serum oder einer Fraktion von Plasma oder Serum durch ein chromatographisches Verfahren, **dadurch gekennzeichnet**, daß die gereinigte Multimerase aus den Fraktionen gewonnen wird, in denen die proteolytische Aktivität zur Inaktivierung von vWF in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors gefunden wird.

45 10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase durch Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder Gelfiltration gewonnen wird.

50 11. Verfahren zur Herstellung eines vWF mit einer Satellitenstruktur durch Inkubieren eines vWF mit einer Singulettstruktur mit einer Multimerase nach Anspruch 1, wodurch ein vWF mit einer Satellitenstruktur erhalten wird und Gewinnen des vWF.

55 12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inkubation in vitro vorgenommen wird.

60 13. Präparation, welche eine gegenüber Plasma mindestens 1000-fach angereicherte Aktivität an Multimerase nach einem der Ansprüche 4 bis 8 enthält.

Hiezu 18 Blatt Zeichnungen

50

55

FIG. 1

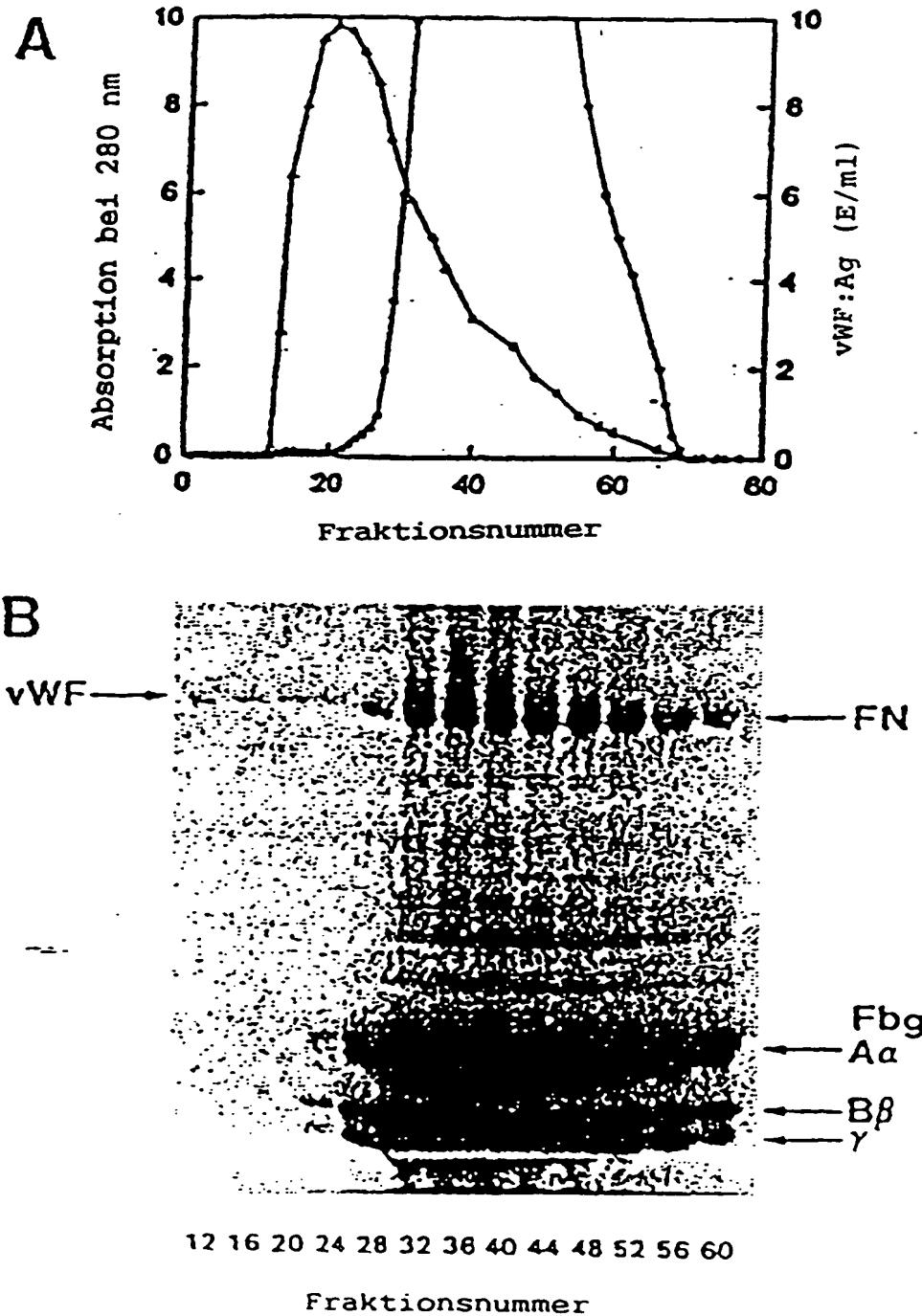
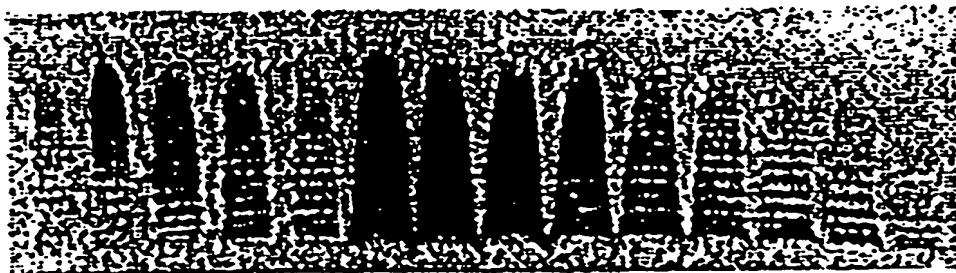


FIG. 2

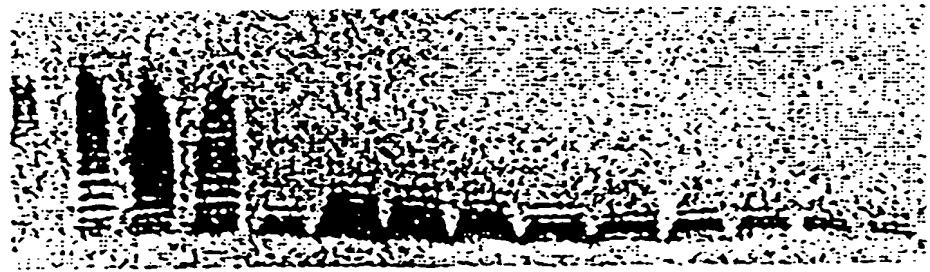
A



11 12 16 20 24 24 28 32 36 40 44 48 52 56
1/10 1/10 1/10 1/10

Fraktionsnummer

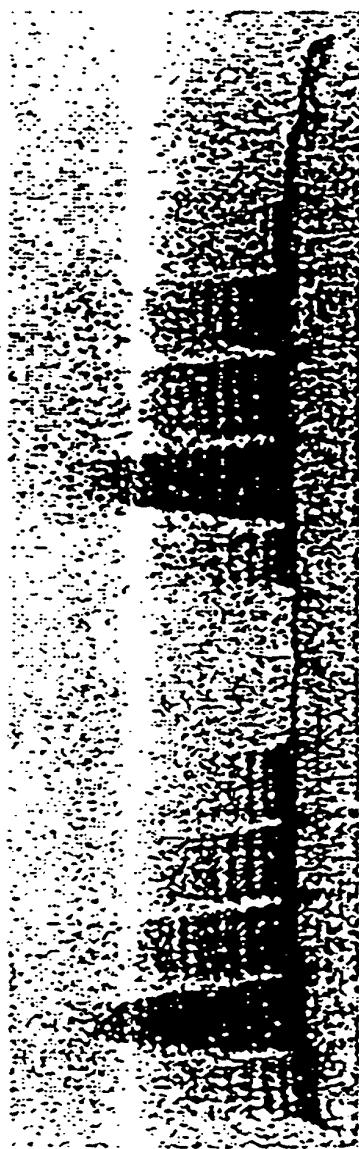
B



11 12 16 20 24 24 28 32 36 40 44 48 52 56
1/10 1/10 1/10 1/10

Fraktionsnummer

FIG. 3



| NaCl (M) | 0 | 0.15 | 0.16 | 0.10 | 0.05 | 0.015 | 0 | 0 | 0.15 | 0.15 | 0.10 | 0.05 | 0.015 | 0 |
|---------------|---|------|------|------|------|-------|---|---|------|------|------|------|-------|---|
| Harnstoff (M) | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| DFP (mM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

FIG. 4

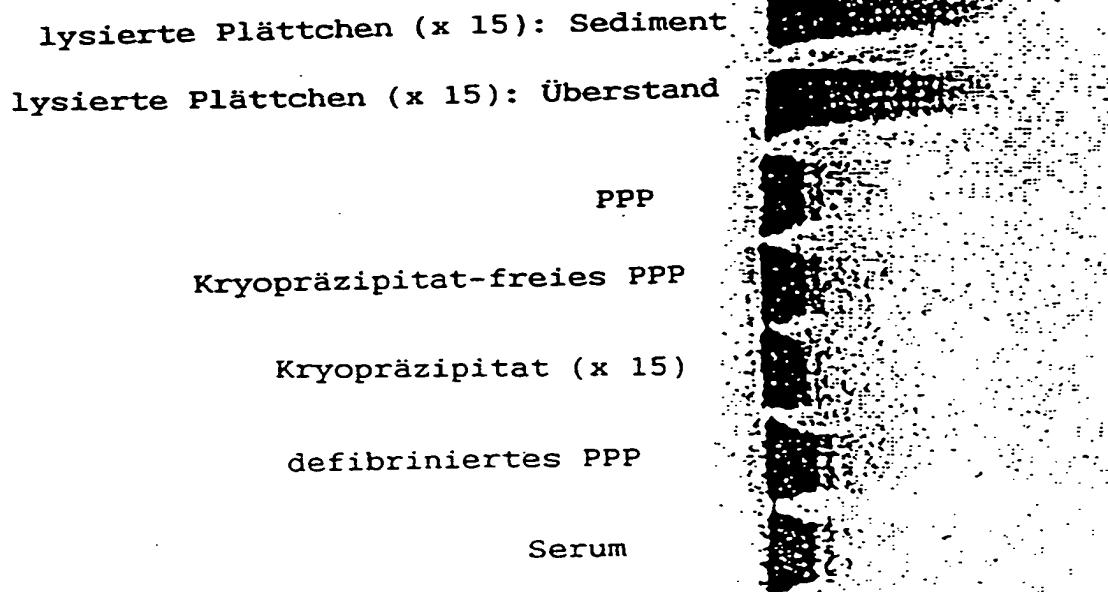


FIG. 5

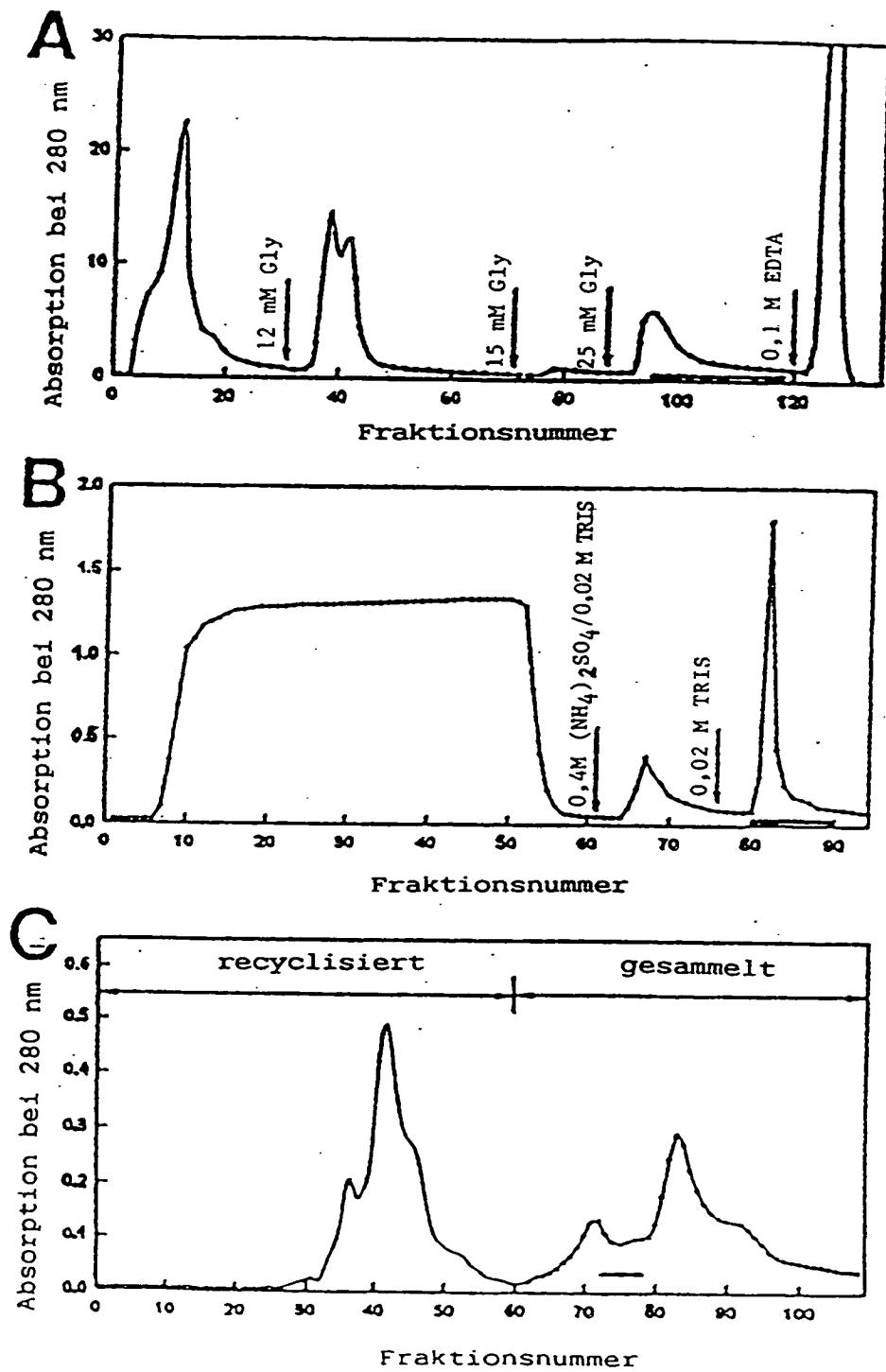


FIG. 6

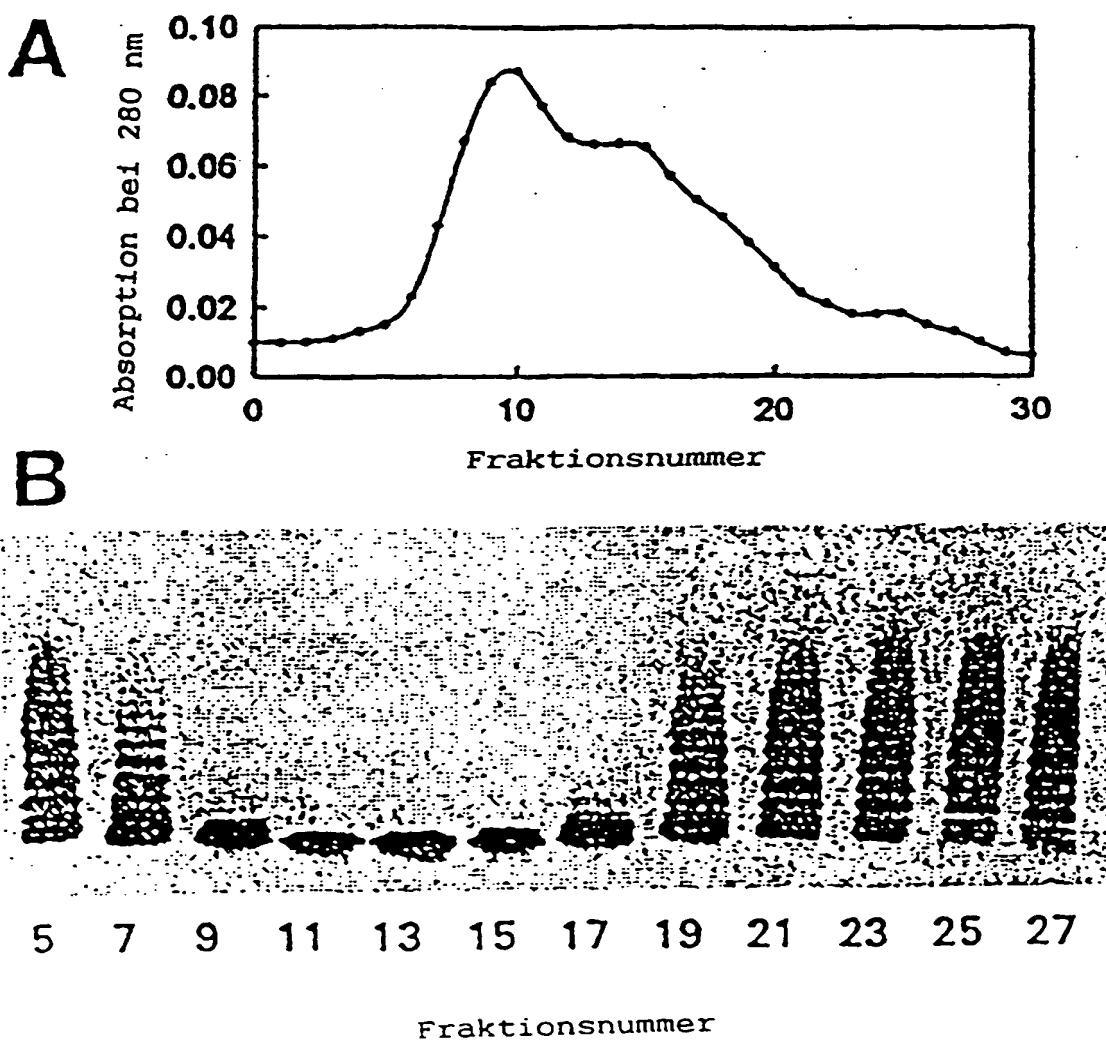


FIG. 7

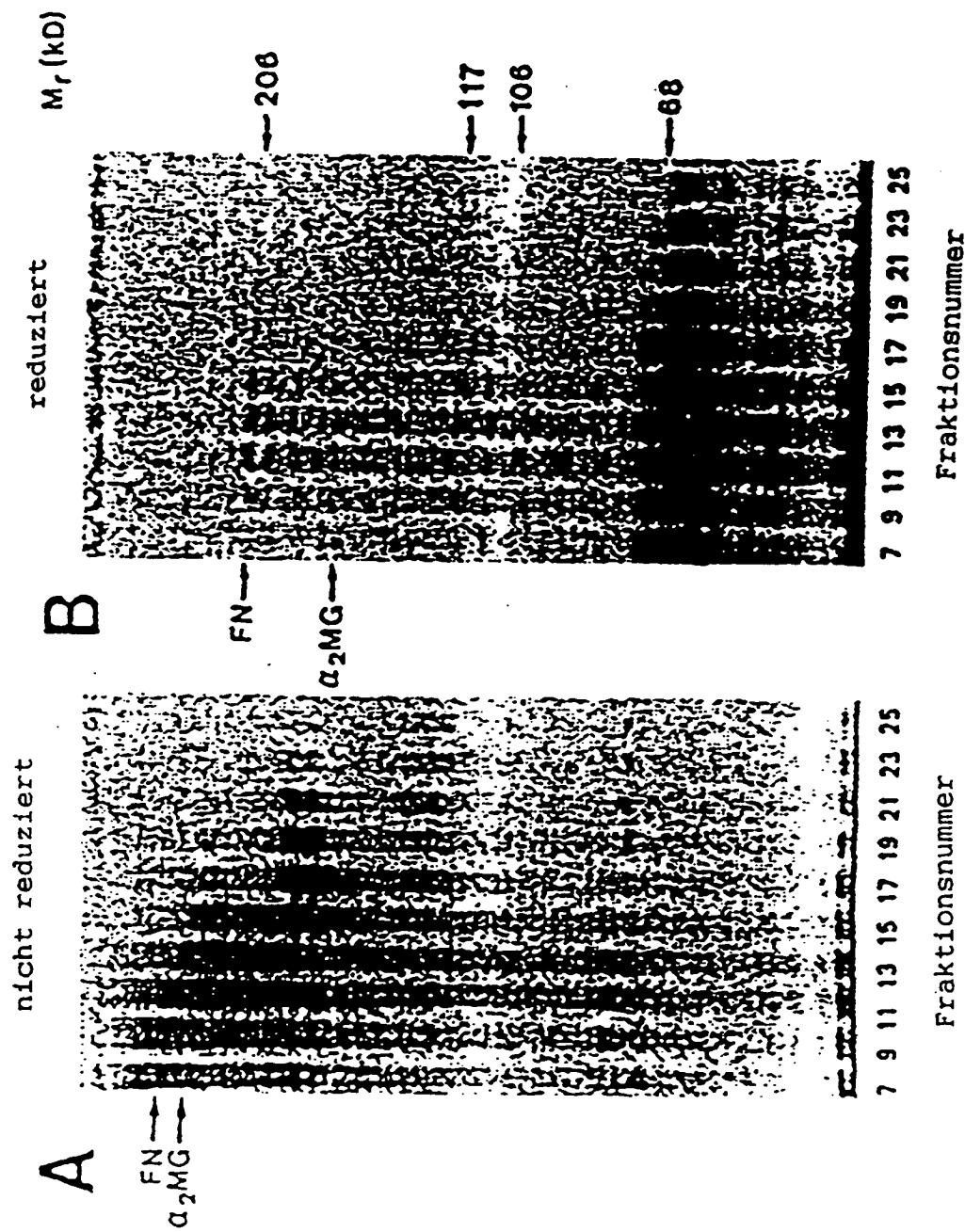
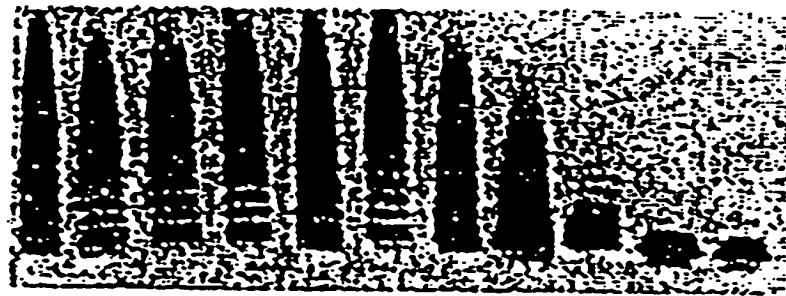


FIG. 8

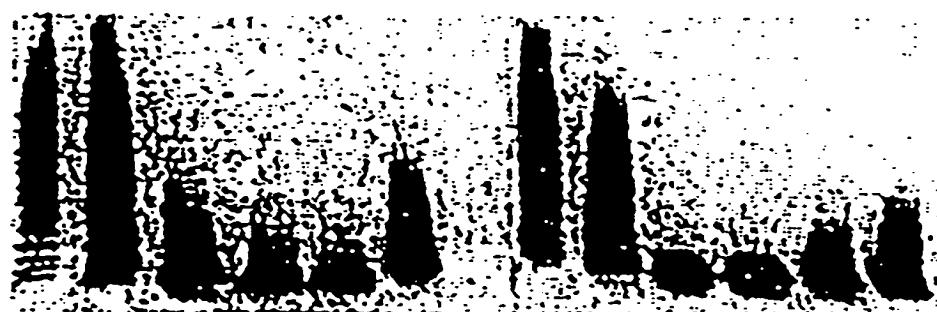
A



Kontrolle

10 mM Zn^{2+}
10 mM Cu^{2+}
10 mM Cd^{2+}
10 mM Co^{2+}
10 mM Ni^{2+}
10 mM Mn^{2+}
10 mM Mg^{2+}
10 mM Ca^{2+}
10 mM Sr^{2+}
10 mM Ba^{2+}

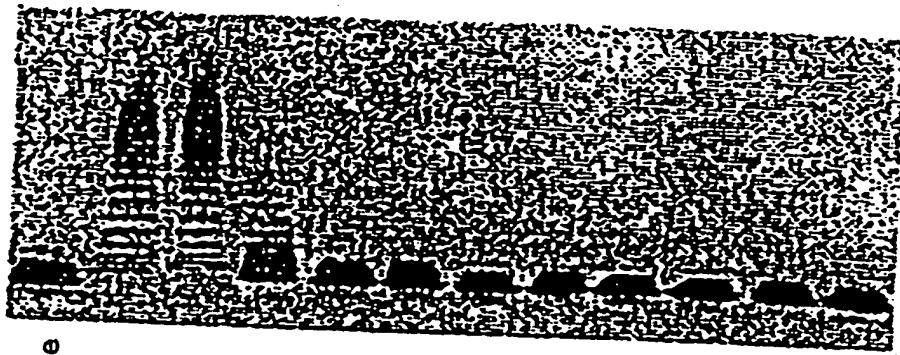
B



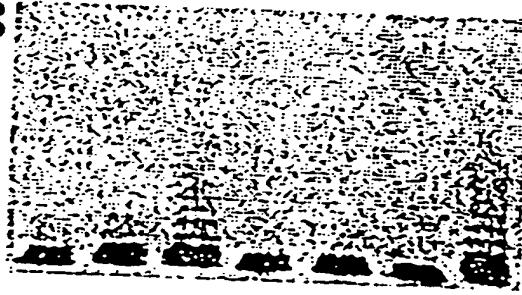
pH 6 7 8 9 10 11 6 7 8 9 10 11
 Ca^{2+} Ba^{2+}

FIG. 9

A



B



Kontrolle

0,1 mM ZLLYCHN₂

0,1 mM ZVYVCHN₂

0,1 mM FACHN₂

0,1 mM ZF(II)ACHN₂

0,1 mM ZYACHN₂

0,1 mM ZFFCHN₂

FIG. 10

M_r

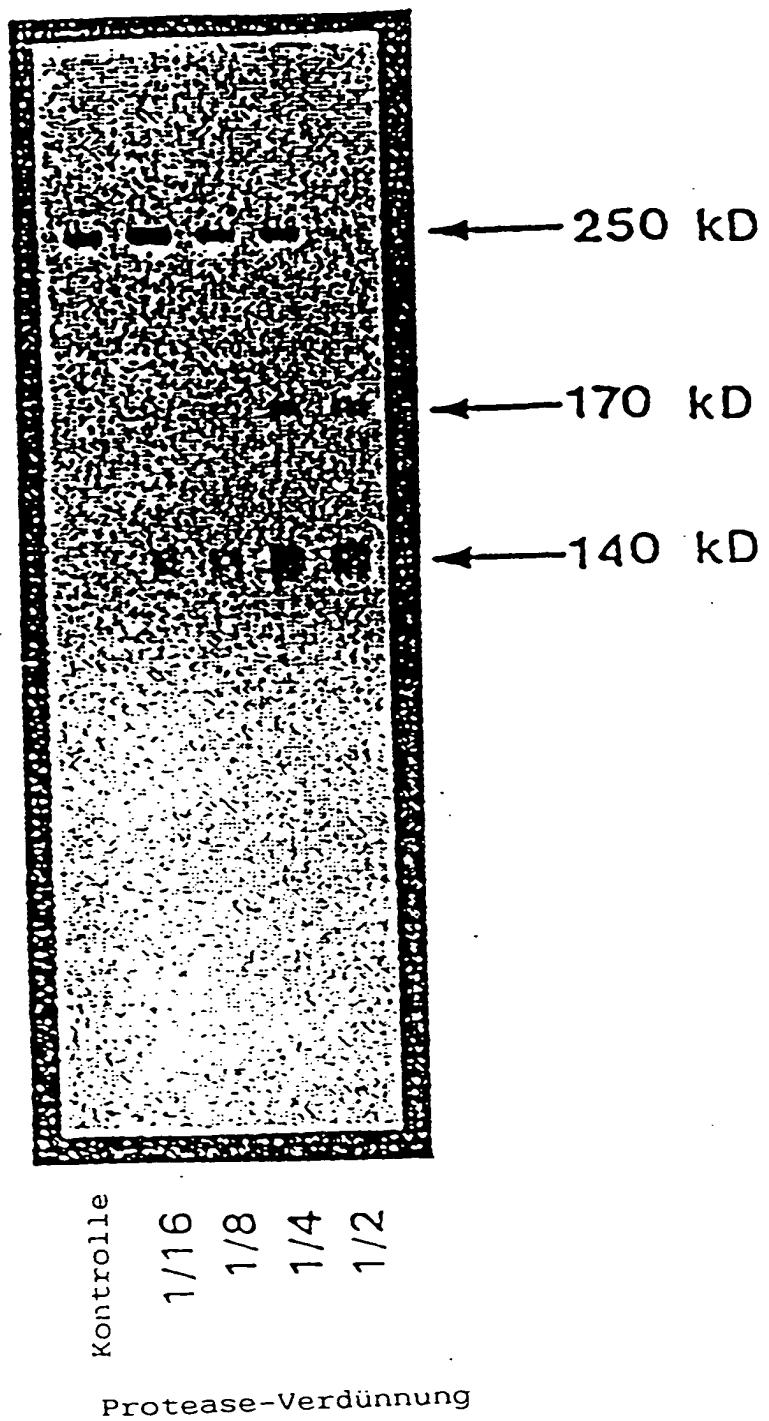
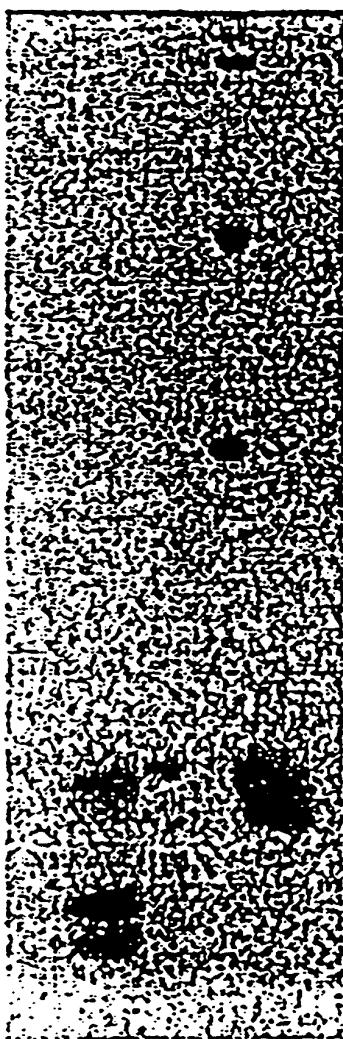


FIG. 11

24h 37°C

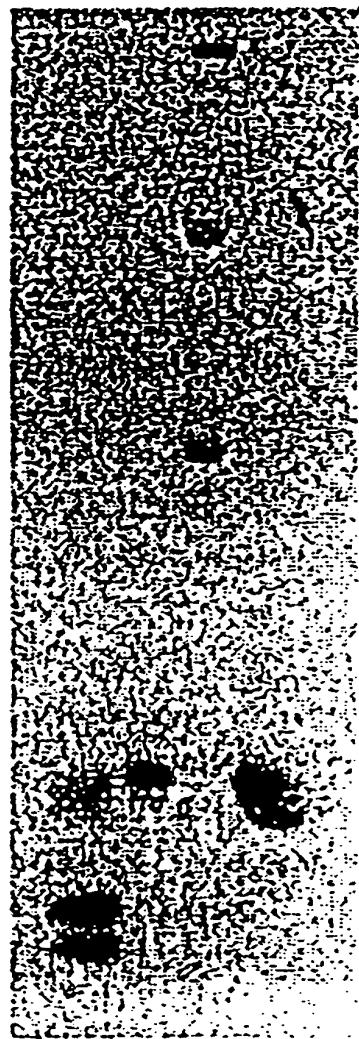
Kontrolle



A B C D

24h 37°C

+ Protease



A B C D

FIG. 12

Abbau von rvWF

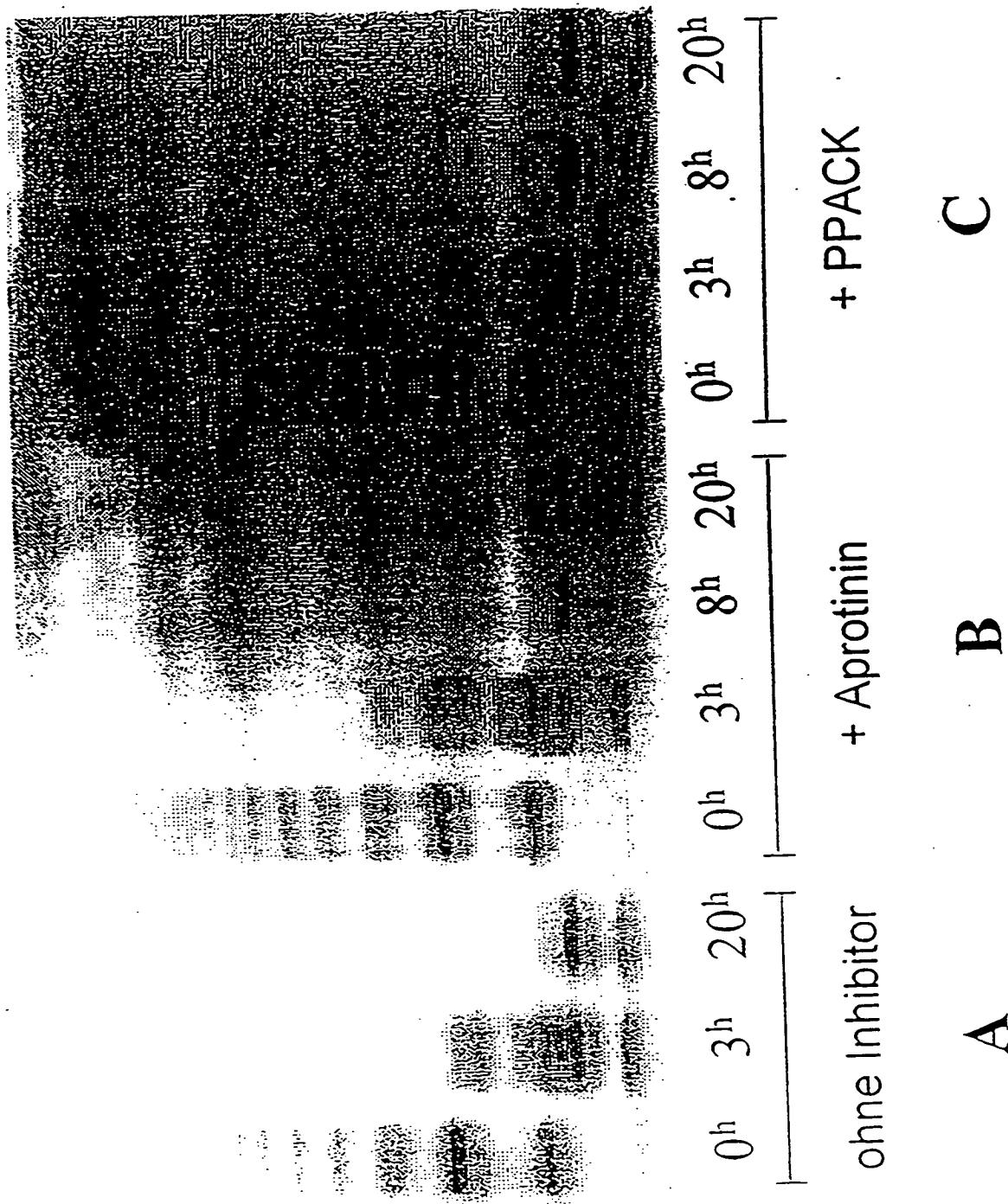


FIG. 13

Abbau von vWF aus Kryopräzipitat

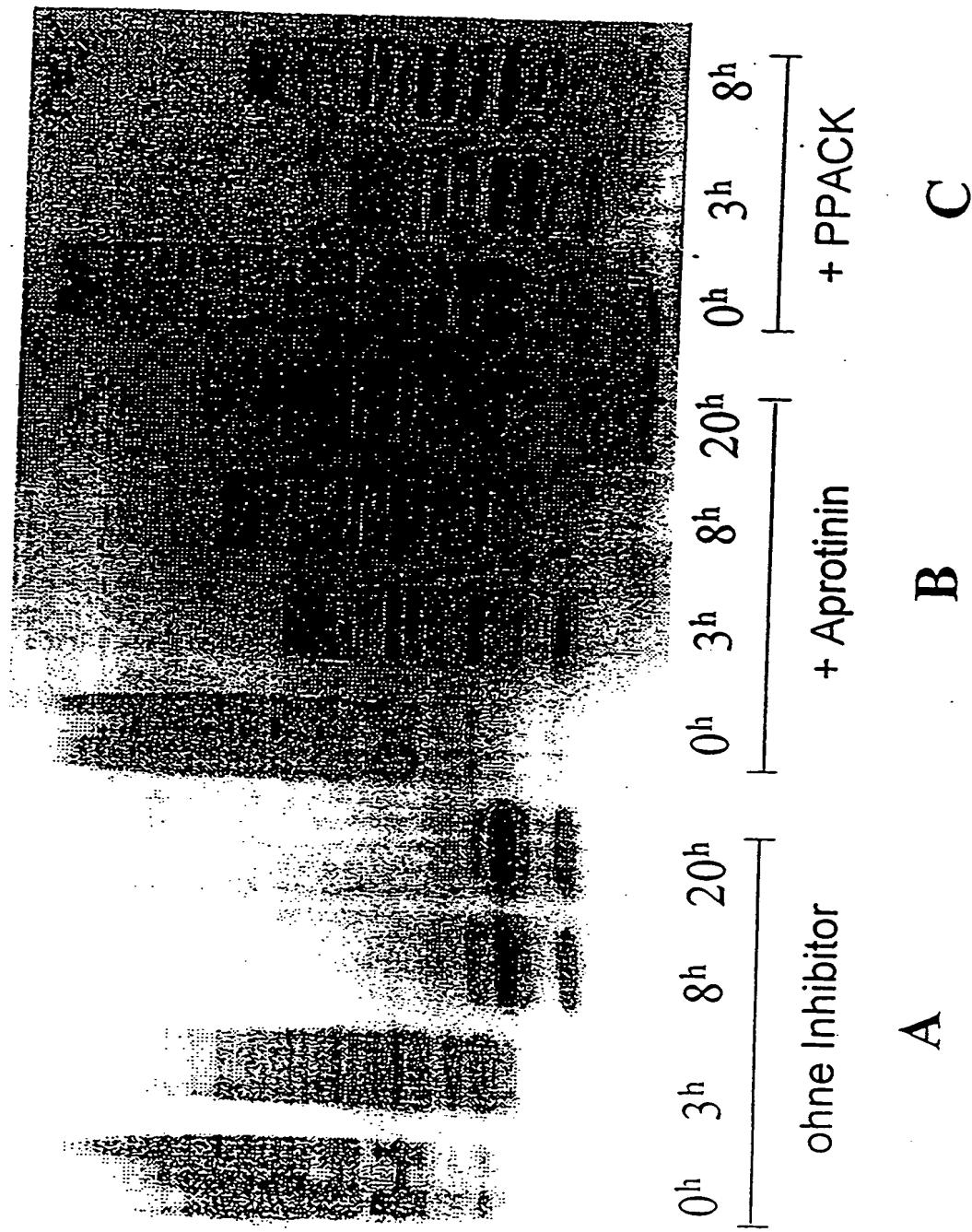


FIG. 14

Abbau von vWF-Hochmultimeren und rvWF

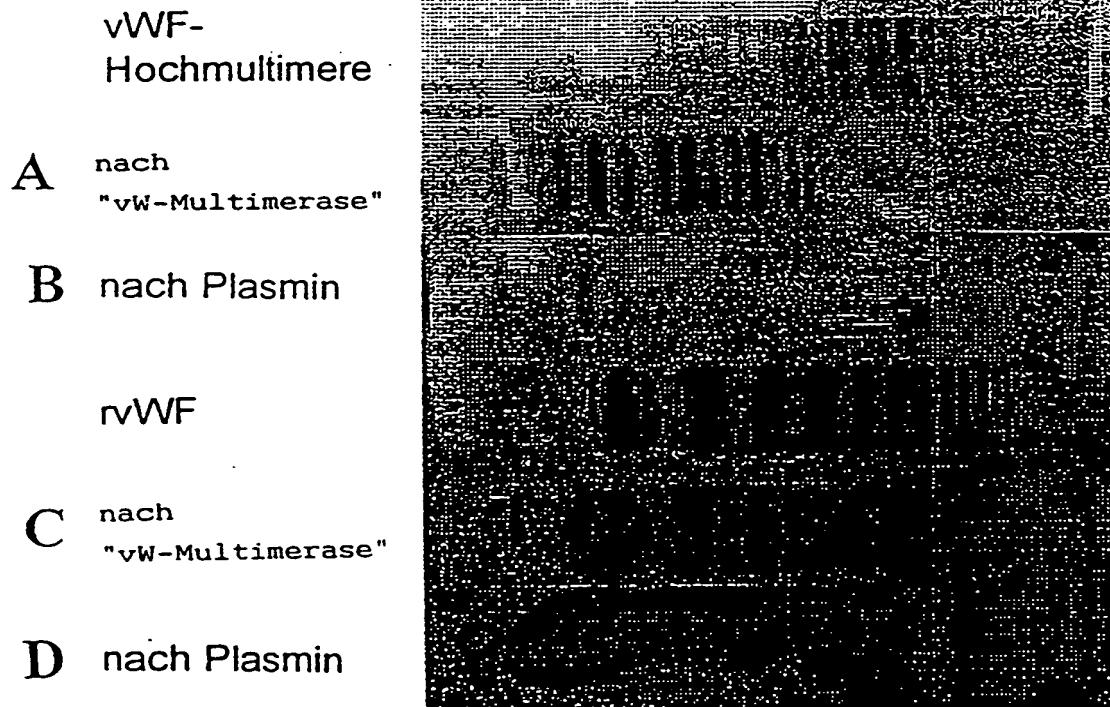


FIG. 15 Abbau von rvWF mit Plasmin (Kinetik)

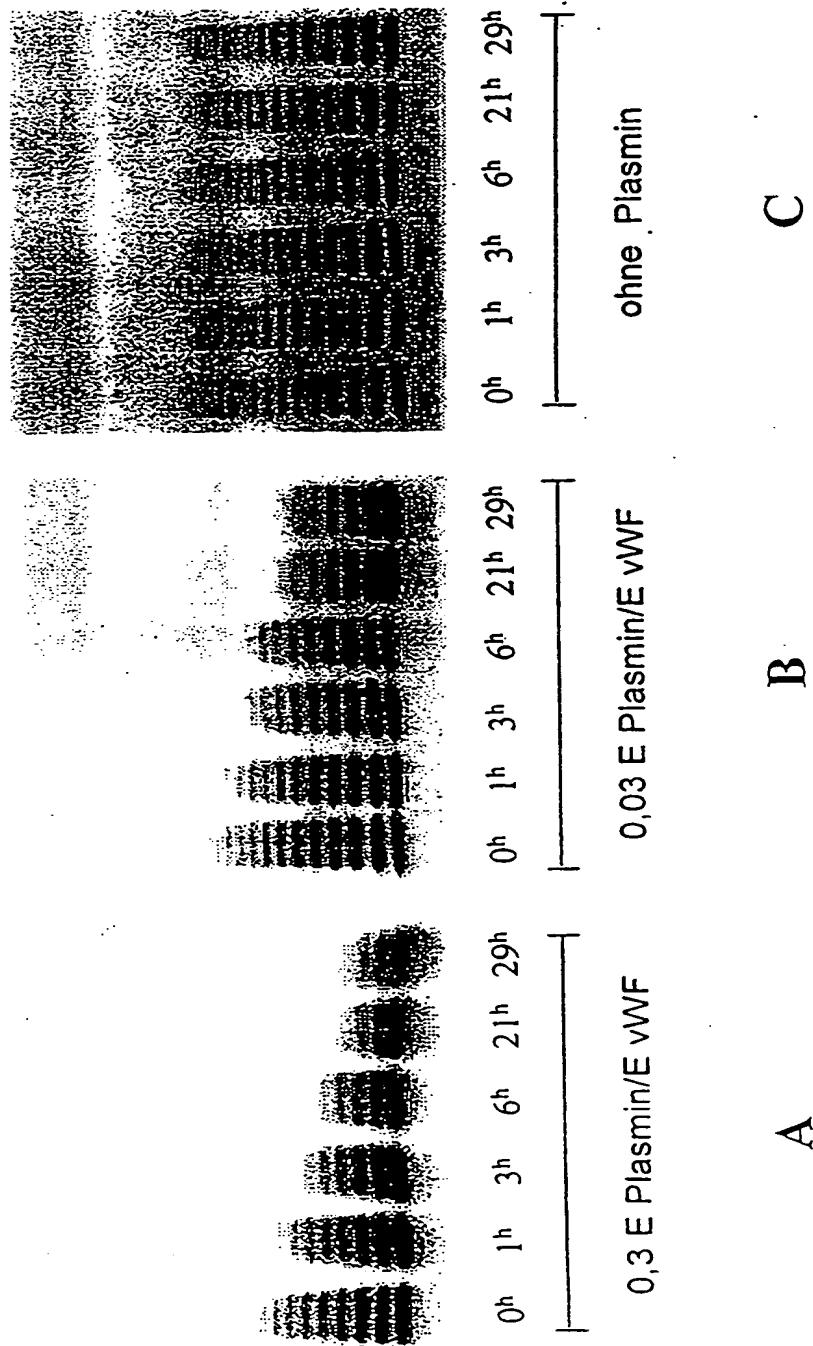


FIG. 16

Abbau von rvWF mit Plasmin \pm Inhibitoren

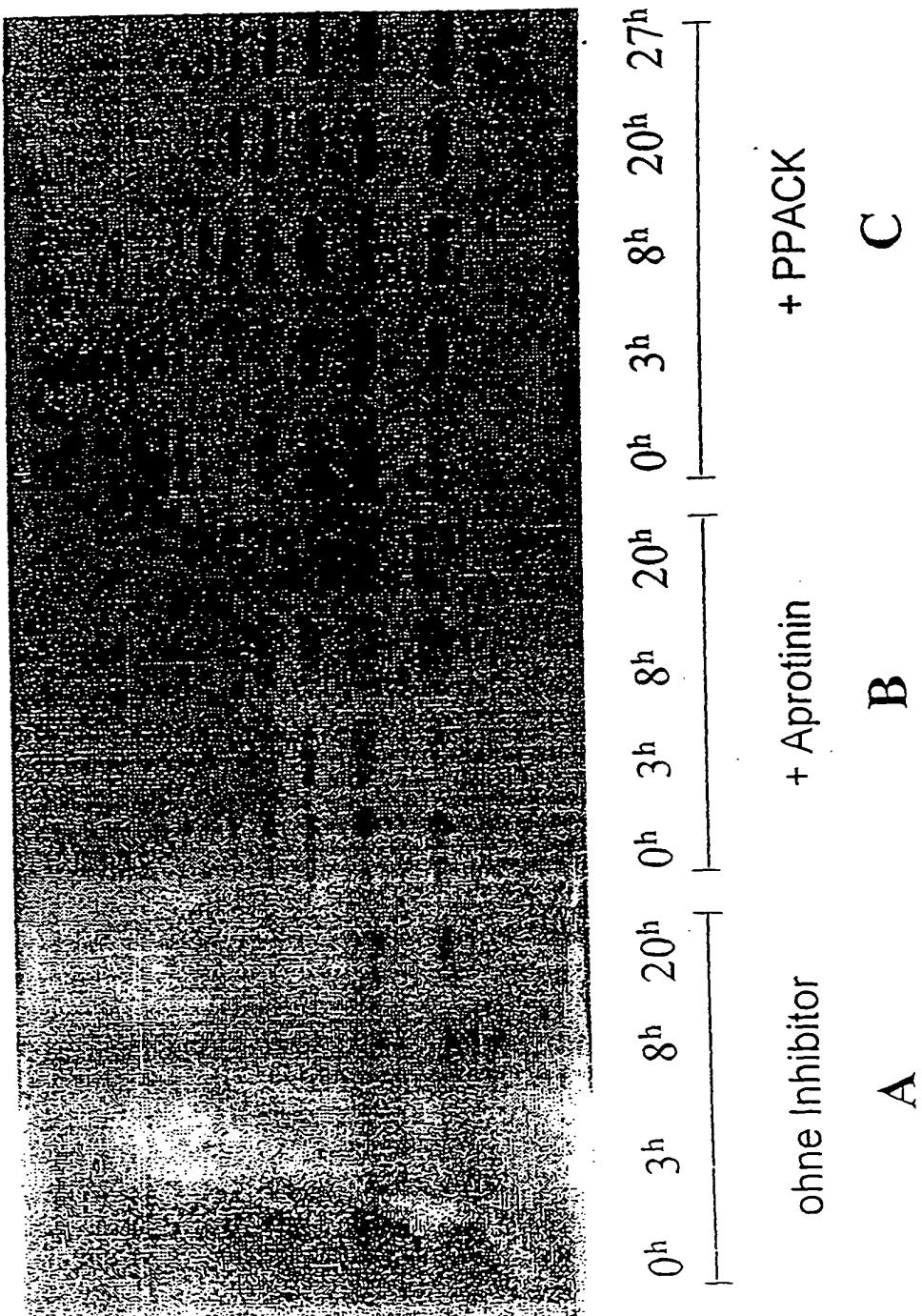


FIG. 17 Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit Plasmin

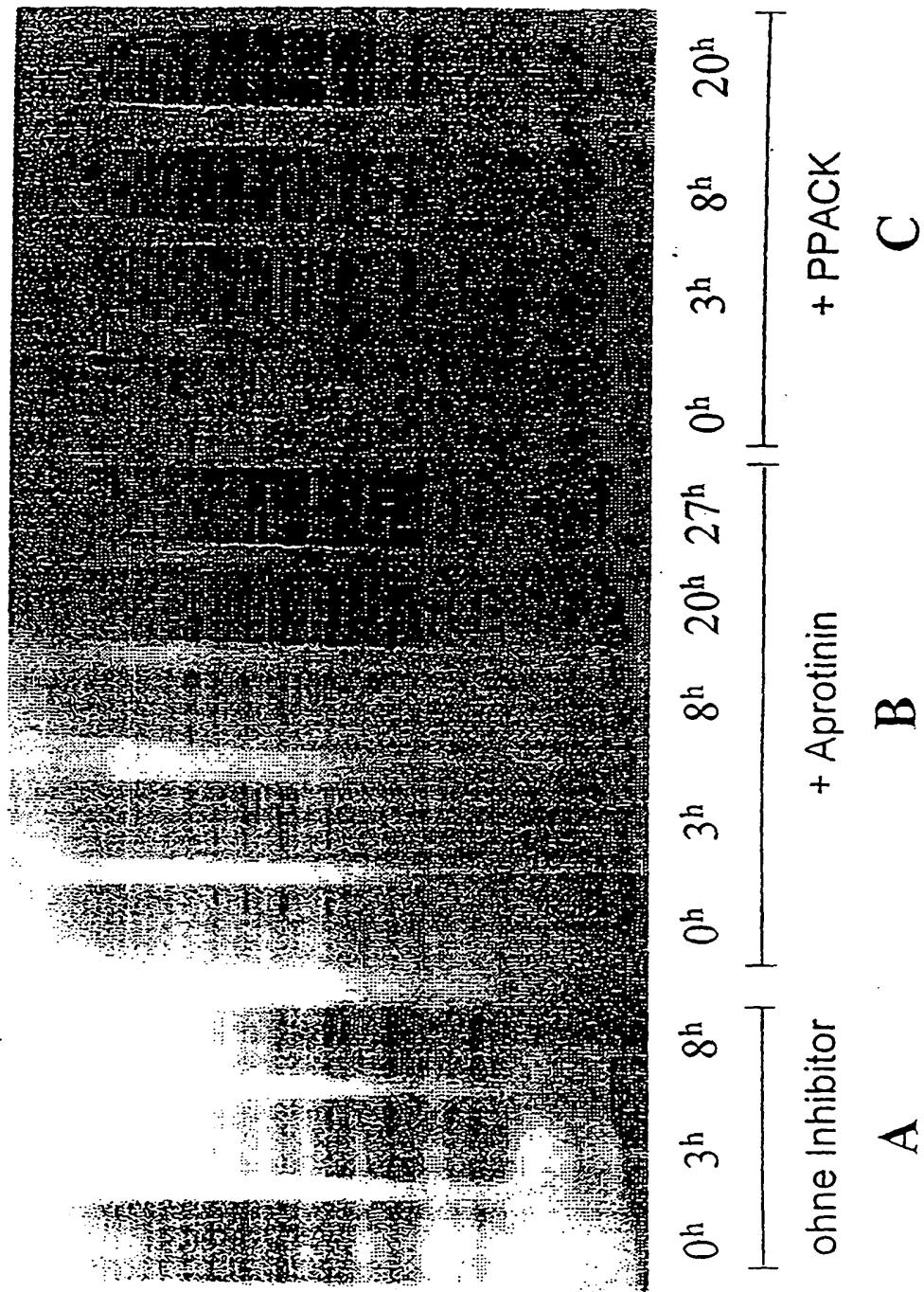


FIG. 18

rvWF-Inkubation in vWF-defizientem, humanem Plasma

